P 6103 B

ISSN 0181-1584

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 1 Fascicule 2. 1980

LABORATOIRE DE CRYPTOGAMIE
MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
12 RUE DE BUFFON, 75005 PARIS



PUBLICATION TRIMESTRIELLE SUBVENTIONNÉE PAR LE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

SOMMAIRE

Les manuscrits doivent être adressés à Madame M.F. ROQUEBERT, Laboratoire de Cryptogamie, 12 rue de Buffon, 75005 Paris.

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 1 Fascicule 2. 1980

Ancienne Revue de Mycologie. Dirigée par Roger HEIM





CRYPTOGAMIE
MYCOLOGIE

CONTENTS

(Tome I, Fasc. 2, 1980)

Marcelle LE GAL

(1895 - 1979)



Marcelle CHOQUART naquit à Amiens, le 14 février 1895. Ses études secondaires achevées en 1912, elle vint à Paris préparer une licence ès-Lettres qu'elle achève en 1915. Songeant d'abord à s'orienter vers une carrière d'enseignement, elle part pour quelques années à New-York où elle exerce dans une institution privée et, en même temps, fréquente l'Université Columbia; elle y obtient le titre de Master of Arts en 1920.

Elle revient alors en France mais ne souhaitant plus poursuivre dans cette voie, accède sur concours à un poste de sous-chef de bureau au Ministère du Commerce. Parmi ses nouveaux collègues se trouve Étienne LE GAL qu'elle épousera en 1922.

Marcelle LE GAL abandonne peu après ses fonctions au Ministère. Elle collabore aux travaux de linguistique auxquels s'adonne Étienne LE GAL et écrit même, par amusement, quelques romans qu'elle ne prendra jamais au sérieux.

C'est seulement vers 1932 qu'elle s'oriente résolument vers la mycologie. Très jeune, et à l'école de son père, Fernand CHOQUART qui était un bon naturaliste en même temps qu'un excellent dessinateur, elle s'intéresse vivement

aux plantes, aux insectes et aux oiseaux, et ce goût pour les choses de la nature ne l'avait en réalité jamais complétement quittée lorsqu'un fait survient qui va déterminer toute sa carrière : gourmet averti, Étienne LE GAL est pris par le démon de la mycophagie et l'entraîne cueillir des champignons dans les forêts des alentours de Paris. Méfiante et redoutant de s'empoisonner, Marcelle LE GAL s'adresse au Laboratoire de Cryptogamie du Muséum, d'abord pour faire vérifier ses récoltes, puis pour apprendre à reconnaître elle-même les champignons.

Alors très vite, son instinct de naturaliste ressurgit avec une vigueur nouvelle: dès juin 1933, elle s'inscrit à la Société Mycologique de France, participe régulièrement à ses activités et, peu après, est invitée par Pierre ALLORGE à travailler comme chercheur libre au Laboratoire de Cryptogamie du Muséum. Recrutée par le Centre National de la Recherche Scientifique en 1944 comme chargée de recherche, promue maître de recherche en 1957, elle a réalisée toute son œuvre scientifique dans ce laboratoire du Muséum.

Avec l'acharnement patient et obstiné qui la caractérisait, et dont la minutie avec laquelle elle réalisait ses dessins est le parfait reflet, Marcelle LE GAL va, tout au long de sa carrière, centrer son activité de recherche sur le groupe des Discomycètes.

Ne pouvant ici développer dans ses détails toute son oeuvre scientifique (1), nous signalerons seulement, à titre d'exemple de son souci permanent d'une observation fine et soignée, le travail sur les ornementations sporales des Discales Operculées qui lui a permis de soutenir en 1944 sa thèse de Doctorat, travail publié en 1947 et pour lequel l'Académie des Sciences lui attribua le Prix Montagne. La classification des Discales Operculées qu'elle propose alors, synthétisant ses propres travaux avec ceux d'Émile BOUDIER et d'autres auteurs, sera reprise sans changements notables par R.W.G. DENNIS en 1960 et en 1968 et, si M. CHADEFAUD, en 1961, s'en écarte quelque peu, les propositions de classification du groupe des Pezizales, faites par R. P. KORF en 1972 utiliseront encore largement ses travaux.

Spécialiste des Discomycètes, ayant atteint une des plus hautes notoriétés et appelée à siéger à la Commission Internationale de Nomenclature, Marcelle LE GAL fut élue en 1954 présidente de la Société Mycologique de France, étant la première femme et, jusqu'à ce jour, la seule à avoir occupé ces fonctions; de son côté, la British Mycological Society l'a choisie comme vice-présidente en 1962. Toutefois, si elle fut honorée de toute la communauté mycologique internationale, Marcelle LE GAL n'avait jamais été hantée par le désir d'une carrière brillante : seul, le travail accompli avait de la valeur. C'est pourquoi elle s'y adonnait avec autant de rigueur, de patience et de minutie, n'hésitant pas, parfois, à venir chercher l'un d'entre nous et lui faire examiner une préparation microscopique pour obtenir une confirmation de son interprétation.

(1) La liste des travaux de Marcelle LE GAL est publiée dans le Bulletin de la Société Mycologique de France, t. 96, fasc. 2 (1980).

Autant elle admettait volontiers l'erreur au cours des herborisations ou des déterminations rapides, autant la crainte de l'erreur, au laboratoire, constituait pour elle un spectre perpétuellement menaçant et pouvait d'ailleurs, à l'occasion, déclencher quelques réactions très vives.

Il est regrettable, bien sûr, qu'elle n'ait pas formé d'élèves; elle ne l'a jamais souhaité, préférant travailler seule. Non pas qu'elle se fut repliée sur elle-même comme ses réactions, aisément bourrues, auraient pu le faire croire. Au contraire, elle aimait la compagnie, accueillait toujours aimablement nos questions et se liait facilement pour de longues conversations par ailleurs intéressantes et instructives car c'était une érudite. En réalité, je pense que la mycologie la passionnait et qu'il lui importait peu de passer du temps à former des élèves plutôt qu'à l'utiliser pour son travail.

Si son oeuvre fut essentiellement d'ordre morphologique, anatomique et systématique, Marcelle LE GAL participa également à des travaux collectifs de floristique comme en témoignent, par exemple, ses monographies régionales sur les Discomycètes de Madagascar et de l'actuel Zaïre, empreintes du même souci d'une étude aussi détaillée que possible de chaque matériel examiné.

Ce fut elle encore qui assura pendant longtemps le service de détermination des champignons au Laboratoire de Cryptogamie du Muséum. Malgré ses plaintes fréquentes sur la servitude que cela représentait, elle aimait un peu, au fond d'elle-même, ce contact avec les amateurs de champignons qui, certains lundis matins, faisaient littéralement la queue derrière sa porte. S'ils parlaient un peu fort, elle sortait vivement et menaçait de les renvoyer, mais celui qui avait franchi sa porte était accueilli très gentiment et patiemment : avec son soin habituel, elle examinait successivement chaque échantillon en indiquant inlassablement les principales caractéristiques à observer pour en déterminer l'espèce, s'attardait sur un commentaire et s'assurait que son visiteur avait bien compris ses explications. Seuls, quelques-uns étaient moins bien reçus : ceux qu'elle appelait les «casseroleurs», simples mycophages qui, refusant l'effort, revenaient trop souvent avec les mêmes espèces sans les avoir reconnues.

L'expérience qu'elle avait acquise, grâce à cette longue pratique, sur les diverses erreurs et hésitations de ceux qui commencent à aborder la mycologie, transparaît d'ailleurs dans son ouvrage riche et original, les «*Promenades mycologiques*», publié en 1957 puis, sous une version révisée, en 1967.

Marcelle LE GAL avait entrepris une révision monographique du genre *Scutellinia* qu'elle n'a malheureusement pas terminée. Lorsqu'elle prit sa retraite, en 1960, consciente de l'énorme travail qu'il lui restait à accomplir, elle voulut instamment être déchargée de toutes autres tâches, en particulier du service des déterminations, et s'y consacra entièrement. Elle y travailla encore une douzaine d'années, accumula une somme considérable d'observations qu'elle avait commencé à synthétiser lorsqu'en 1972, Étienne LE GAL disparut. N'ayant pas d'enfants, ce dont elle avait toujours souffert, désorientée et sa vue commençant à s'affaiblir, elle ne résista pas à cette épreuve : tout, pour elle, est soudain devenu vain, hormis l'attente du jour où elle pourrait rejoindre dans la mort

son compagnon d'un demi-siècle. Malgré les exhortations amicales et les tentatives de réconfort, elle devait bientôt se retirer définitivement à Amiens, n'emportant même pas ses notes sur les *Scutellinia* ni la première rédaction partielle de sa monographie, abandonnées dans son appartement de Paris où elle ne revint plus. Elle décèdera à Amiens le 23 juin 1979, des suites d'une opération de la cataracte.

Bien qu'elle ne nous ait pas livré la totalité de son oeuvre, Marcelle LE GAL figure parmi ceux qui ont marqué d'une empreinte profonde la mycologie du XXe siècle. Toutefois, sa personnalité était plus riche encore. Nous avons eu l'occasion d'évoquer son érudition, fruit de ses études initiales d'une part, au cours desquelles elle s'était particulièrement intéressée à l'histoire et à la géographie, puis de son étroite collaboration aux travaux d'Étienne LE GAL. Mais en plus, malgré des apparences parfois un peu rudes, elle a toujours entretenu au fond d'elle-même ce qui lui paraissait être l'essentiel : sa profonde affectivité féminine. En Marcelle LE GAL, ce n'est pas seulement la mycologue, mais aussi l'érudite et, plus simplement, la femme dont nous déplorons la disparition.

Patrick Joly

L'ALTÉRATION DES BOIS D'OEUVRE DE HETRE (FAGUS SILVATICA L.)

par Fusarium solani (Mart.) Sacc. et Verticicladiella procera Kendrick

par G. KILBERTUS, F. MANGENOT, D. RADTKE*

RÉSUMÉ. — L'altération du bois de hêtre par *Fusarium solani* et *Verticicladiella procera* a été étudiée en microscopie électronique durant 4 semaines. Les mécanismes et les possibilités de biodégradation des hyphes sont déjà évidents après cette période. L'action de *V. procera* se traduit essentiellement par une érosion de la surface interne des parois végétales, les passages de cellule à cellule se faisant par les ponctuations. *F. solani* est capable en plus de perforer les parois et d'utiliser rapidement la couche S_2 de ces dernières.

SUMMARY. — Alteration of beech wood by *Fusarium solani* and *Verticicladiella procera* was studied with electron microscopy for 4 weeks. Mechanisms for, and potentials of biodegradation were evident even after this short incubation time. *V. procera* mainly eroded the internal surface of cell walls; the hyphae passed from cell to cell by pits. *F. solani* was able to perforate walls and to use the S_2 layer.

INTRODUCTION

L'envahissement parfois rapide des bois d'œuvre, par les microorganismes, est en partie lié au manque de concurrents normalement présents dans les conditions naturelles. La dégradation, en l'absence de chaînes trophiques et d'action conjuguée des germes, se traduit alors par des altérations plus ou moins caractéristiques en fonction du champignon lignivore considéré et de la nature du substrat envahi.

* Université de Nancy I. Centre de 2e Cycle, Laboratoire de Botanique et de Microbiologie, Case Officielle n° 140, 54037 Nancy Cedex.

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE *(Cryptog. Mycol.)* TOME 1 (1980).

Ces modifications provoquées par l'action hyphale ne se traduisent pas seulement par la métabolisation du tissu ligneux, mais également par une diminution de la valeur marchande du produit, par suite de l'altération de la teinte par exemple. C'est pourquoi il est très important de connaître les modalités d'attaque du bois par les microorganismes, en particulier au cours des tous premiers stades, de façon à pouvoir les contrôler ou les éviter par la suite.

Dans la présente étude, nous allons étudier en microscopie électronique l'altération du bois d'œuvre de hêtre, sous l'influence de deux ascomycètes : *Fusarium solani* et *Verticicladiella procera*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) **Préparation des buchettes** (voir schéma a)

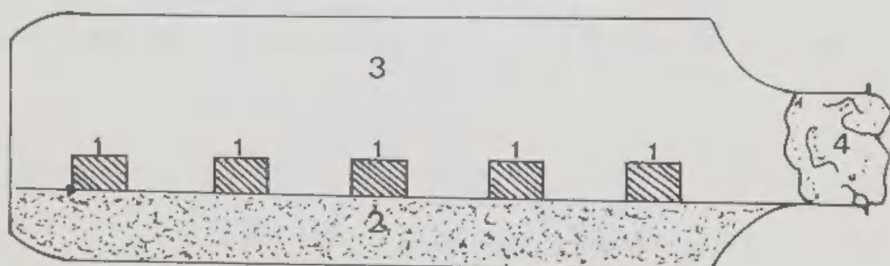
Les buchettes de 5 cm de long sur 0,8 cm de large et 0,5 cm de haut, ont été fabriquées à partir d'une planche de hêtre (*Fagus silvatica* L.) provenant de la forêt d'Amance (54 France).

a. Echantillon expérimental :



b. Méthode d'incubation :

1. **Buchette**
2. **Milieu de culture**
3. **Fiole de Roux**
4. **Coton**



2) **Incubation** (voir schéma b)

Deux champignons, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. et *Verticicladiella procera* Kendrick, sont cultivés en fioles de Roux, sur milieu malt-gélosé (15 g de malt, 15 g de gélose pour un litre d'eau). Lorsque le champignon a envahi uniformément la surface du milieu, on introduit aseptiquement 5 buchettes stériles par fiole. Les durées d'incubation, à 20°C, sont respectivement de 2 et 4 semaines.

3) **Études en microscopie électronique**

a) Microscopie électronique à balayage

Des cubes de 0,5 cm de côté, sont préparés à partir des buchettes attaquées. La face transversale est affinée au microtome à congélation. Les échantillons sont ensuite fixés au glutaraldéhyde à 2% et au permanganate de potassium à 2%. Ils sont ensuite déshydratés à l'acétone, desséchés au point critique puis métallisés à l'or palladium.

b) Microscopie électronique à transmission

Des écailles de buchettes, prélevées dans les parties en contact avec le mycélium, sont fixées sous vide à l'OsO_4 à 2% durant deux heures. Après inclusion dans l'épon, les coupes fines obtenues sont contrastées au citrate de plomb (REYNOLDS, 1963).

RÉSULTATS

Les cubes témoins montrent une face transversale A, présentant de nombreux vaisseaux et des coupes longitudinales B avec des rayons multisériés C et unisériés D (fig. 1). Les ponctuations lenticulaires sont également très fréquentes (fig. 2). Ces nombreux orifices constituent autant de points de pénétration potentiels des mycéliums dans la mesure où les conditions climatiques ambiantes sont favorables. Le faible diamètre de ces cavités permet en outre la persistance de tensions élevées en eau, particulièrement propices au développement des champignons.

1) *Fusarium solani*

Après deux semaines de contact, ce champignon a colonisé les lumières cellulaires des éléments ligneux (fig. 4 et 5). Durant cette même période, il perfore les parois en émettant des expansions latérales au niveau de la couche S_2 (fig. 3). Cette image semble témoigner d'une action mécanique, avec écartement des différentes couches. Déjà en 1955, MEIER avait signalé que cette partie S_2 de la paroi des tissus ligneux des feuillus était attaquée en priorité, la dégradation se propageant vers la lamelle moyenne.

La traversée des parois peut également se réaliser selon un processus comparable à celui observable sur la figure 6. L'activité enzymatique se situe à la partie antérieure de l'hyphe, comme le prouvent les modifications ultrastructurales constatées à ce niveau. D'autre part le diamètre de l'hyphe, initialement compris entre 4 et 5 µm, passe à 1 µm dans la zone perforée. Des modifications sem-

blables ont été notées par BAYLISS (1908), NUTMANN (1929) et MEIER (1955). UNLIGIL et CHAFE (1974) (étude réalisée au cours de la dégradation du bois de *Picea glauca* par une pourriture molle) et MAC DONALD et MAC NABB (1971) (traversée des parois de *Ulmus carpinifolia* par *Ceratocystis ulmi*) ont présenté des images comparables en microscopie électronique.

Après 4 semaines d'incubation, on peut voir des altérations particulières (fig. 7). La surface interne de la paroi devient irrégulière et se charge plus ou moins d'éléments sphériques denses aux électrons. Dans le cas de la fig. 7, on peut en outre observer des cloisons typiques d'ascomycètes, le pore central étant obturé par un corps de Woronine. Enfin, la surface de l'hyphe est fréquemment recouverte par des expansions fibrillaires (fig. 8 et 9).

2) *Verticicladiella procera*

Comme dans le cas précédent, après deux semaines d'incubation, le plan ligneux est parcouru par le mycélium, mais l'invasion est plus importante (fig. 10).

Après quatre semaines, on rencontre fréquemment des hyphes au contact des ponctuations (fig. 13), principales voies de passage des hyphes d'une cellule à l'autre. Les effets de l'attaque se traduisent par une érosion de la surface interne de la paroi végétale (fig. 11), la partie superficielle de cette dernière devenant souvent dense aux électrons (RADTKE, 1979). A ce stade, le cytoplasme du champignon est dense et les différents organites intracellulaires sont reconnaissables. L'émission de petits granules de mélanine est également constatée en surface de l'hyphe (fig. 11 et 13).

Après cette période d'incubation, le cytoplasme a tendance à s'éclaircir.

CONCLUSIONS

Incubées dans les mêmes conditions, les deux espèces fongiques utilisées présentent un comportement différent :

- *Fusarium solani*, après pénétration dans le substrat, érode activement les surfaces internes des parois végétales, au cours du cheminement des hyphes dans les cellules. Mais cette espèce est également capable de perforer les parois et d'utiliser rapidement la couche S_2.

- *Verticicladiella procera* semble se déplacer préférentiellement dans la lumière des cellules, les passages entre ces dernières s'effectuant par l'intermédiaire des ponctuations. Son activité lytique se traduit également par une érosion de la surface interne des parois végétales.

Tous les mécanismes et possibilités de biodégradation des hyphes sont déjà évidents après quatre semaines d'incubation. Les essais que nous avons effectués après huit semaines (RADTKE, 1979), n'ont fait que confirmer nos premières observations. Les modifications ultérieures ne concernent plus que l'intensité de la pénétration du mycélium dans le bois, les modalités d'altération restant les mêmes.

L'observation en microscopie électronique constitue donc une technique relativement rapide pour mettre en évidence, non seulement le potentiel enzymatique des souches testées, mais également leur comportement vis-à-vis des substances protectrices, ce qui fera l'objet de nos prochaines expériences.

Nous exprimons nos remerciements à Mr M. MORELET du Laboratoire de Pathologie forestière du CNRF de Champenoux, qui nous a fourni les souches fongiques.

BIBLIOGRAPHIE

BAYLISS J.S., 1908 — The biology of *Polystictus versicolor* Fries . *J. Ec. Biol.* 3 : 1-24.

MAC DONALD W. et MAC NABB J.R., 1970 — Fine structural observations of the growth of *Ceratocystis ulmi* in Elm xylem tissue. *Bio Science* 20 : 19.

MEIER H., 1955 — Uber den Zellwandabbau durch Holzvermarschungspilze und die Submikroskupischestruktur von Fichtentracheiden und Birkenholzfasern. *Holz als Roh als und Werk*, Heft 9.

NUTMAN F.J., 1929 - Studies on wood-destroying Fungi. I. *Polyporus hispidus* Fr. *Ann. Appl. Biol.* 16 : 40-64.

RADTKE D., 1979 - Décomposition du bois de Pin et de Hêtre par des champignons lignicoles. Standardisation d'une méthode d'étude. DEA Université de Nancy I, 70 p.

REYNOLDS E.S., 1963 The use of lead citrate at high pH as an electron optique stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17 : 171-191.

UNLIGIL H.H. et CHAFE S.C., 1974 - Perforation hyphae of soft rot fungi in wood of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss.). *Wood Science and Technology, New York* 8 : 27-32.

LÉGENDES DES PLANCHES (Les échelles sont données en μm)

Pl. I. — 1: Cube de hêtre montrant la face transversale A, la coupe longitudinale B, les rayons multisériés C et unisériés D. 2: Ponctuations lenticulaires dans un vaisseau de hêtre. 3: Perforation et écartement mécanique des différentes couches de la paroi cellulaire de hêtre par les expansions émises par l'hyphe de *Fusarium solani*. Incubation : 2 semaines. 4: Mycélium de *Fusarium solani* dans les vaisseaux de hêtre. Incubation: 2 semaines. 5: Mycélium de *Fusarium solani* cheminant dans la lumière des cellules de hêtre. Incubation: 2 semaines.

Pl. II. — 6: Perforation d'une paroi de cellule de hêtre avec amincissement de l'hyphe de *Fusarium solani*. Incubation: 2 semaines. 7: Mycélium de *Fusarium solani* au contact d'une paroi de cellule de hêtre. La cloison de l'hyphe avec ses corps de Woronine est caractéristique des ascomycètes. Érosion de la paroi. Incubation: 4 semaines. 8: Hyphes se développant à proximité d'une ponctuation. Apparition de substances denses aux électrons à la surface interne de la cellule de hêtre et autour de l'hyphe de *Fusarium solani*. Incubation: 4 semaines. 9: Hyphe de *Fusarium solani* contenue dans une fissure provoquée par l'écartement des cellules de hêtre. Incubation : 4 semaines.

Pl. III. - 10: Hyphes de *Verticicladiella procera* dans la lumière des vaisseaux et des fibres de hêtre. Incubation: 2 semaines. 11: Hyphes de *Verticicladiella procera* à la surface interne de la paroi cellulaire de hêtre. Érosion de cette surface. Incubation: 2 semaines. 12: Hyphe de *Verticicladiella procera* dans la lumière d'une cellule de hêtre. Le cytoplasme s'est éclairci et la paroi, dense aux électrons, libère des granules de mélanine. Incubation: 8 semaines. 13: Mycélium de *Verticicladiella procera* à proximité d'une ponctuation de bois de hêtre. Le protoplasme est dense. Incubation : 4 semaines.

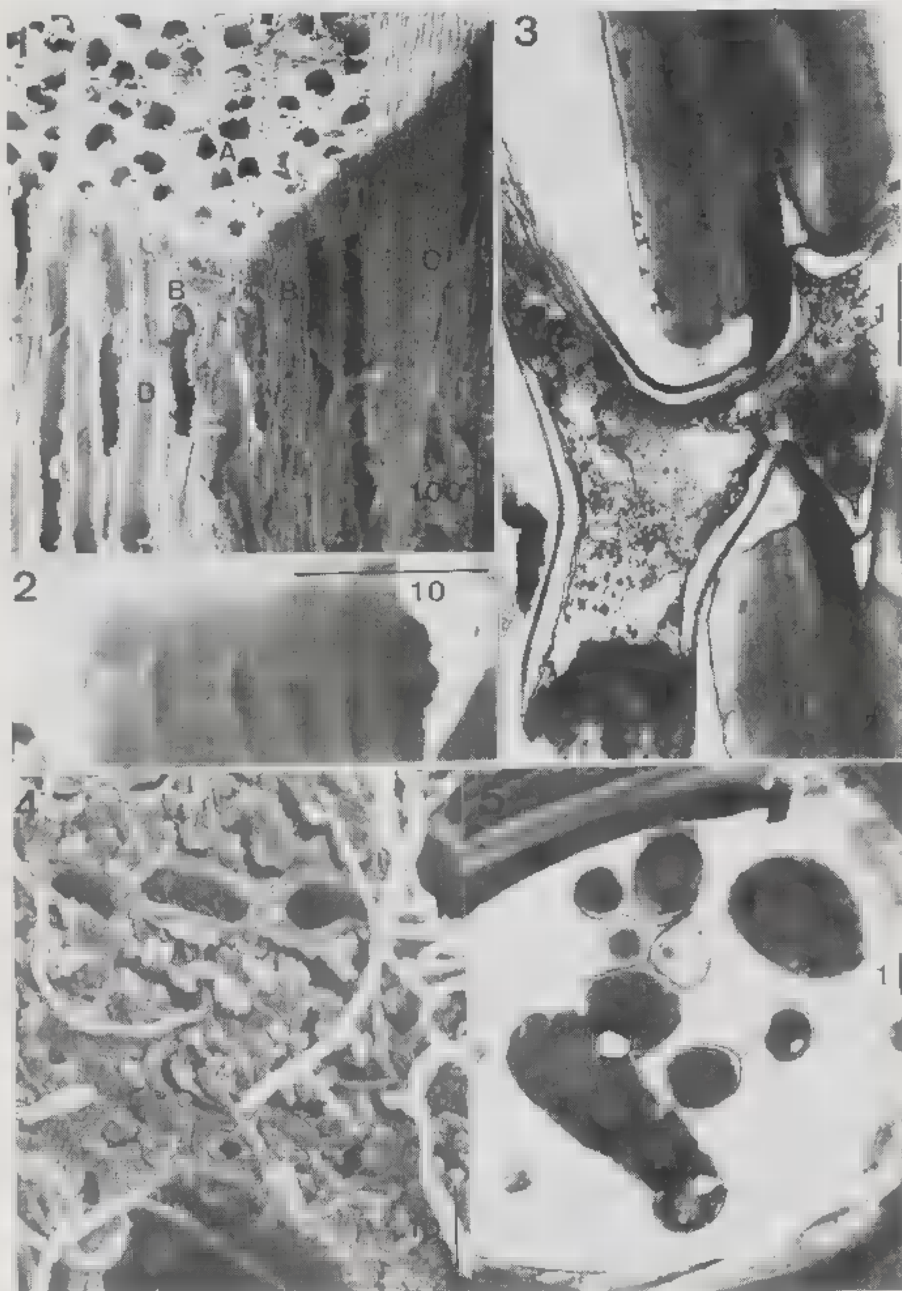


Planche I

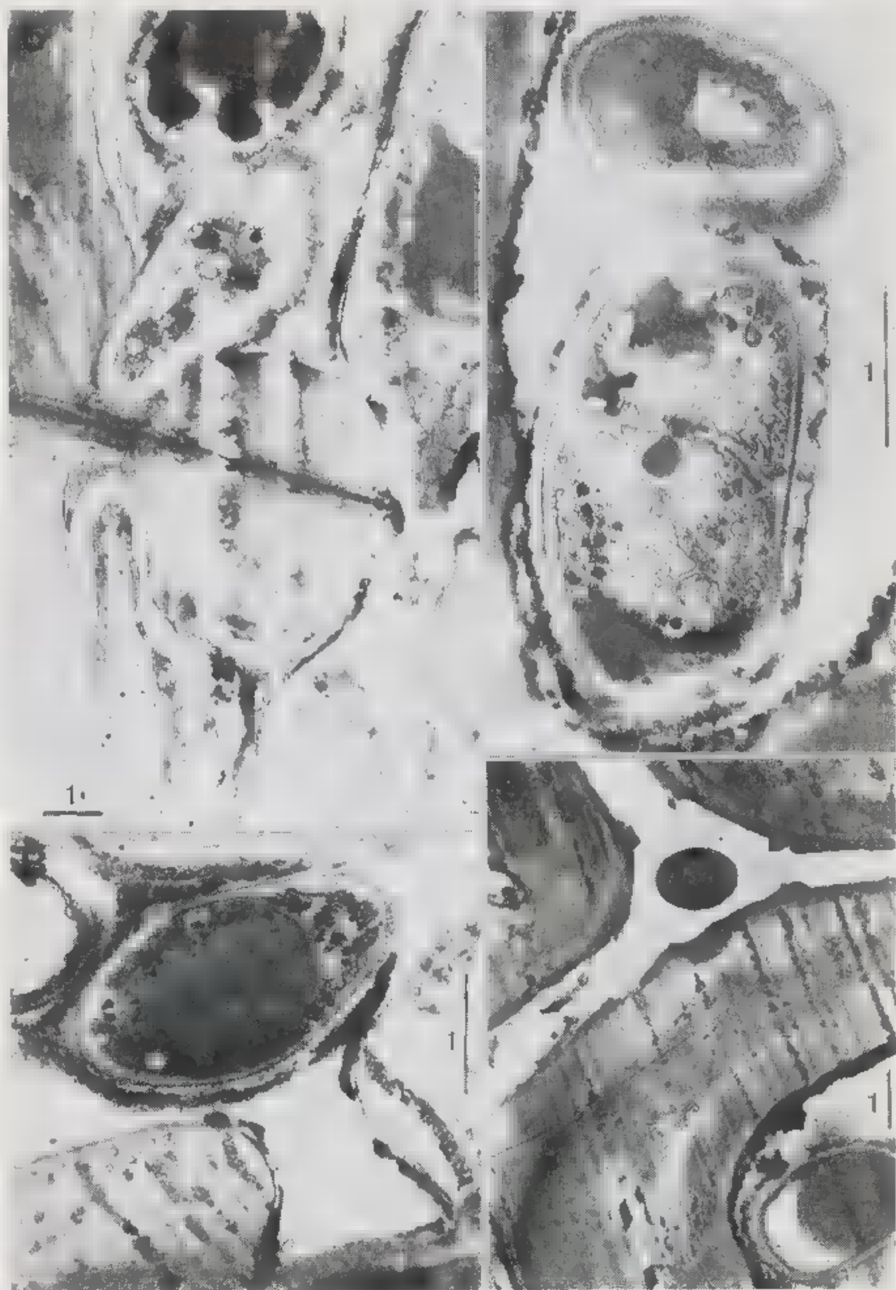
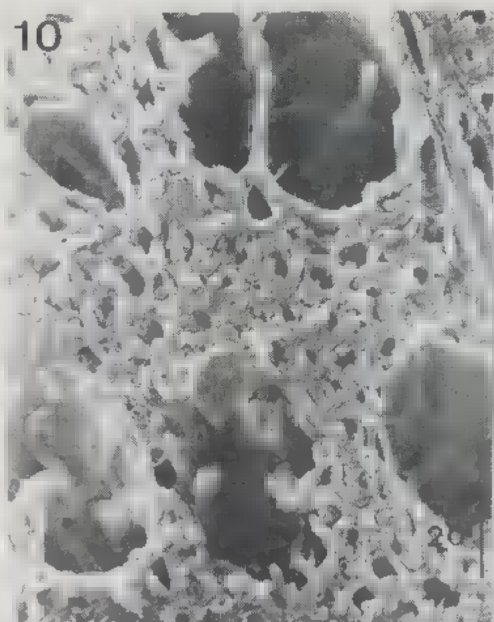
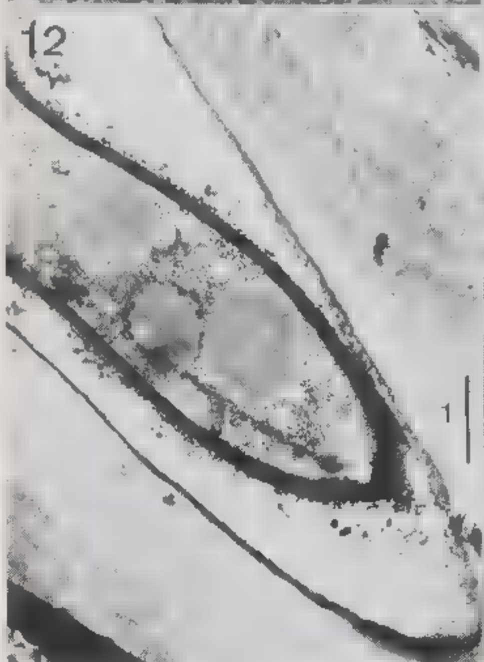


Planche II







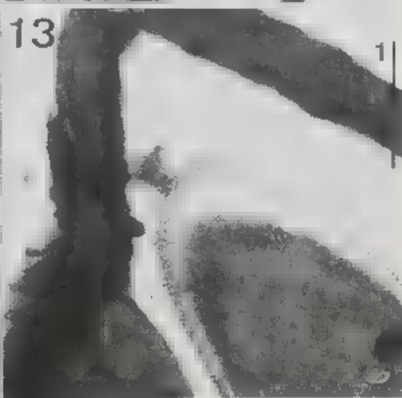


Planche III

A NOTE ON THE CLASSIFICATION OF MICROSPHAERA MOUGEOTII LÉV.

par H.J. BOESEWINKEL*

SUMMARY. – A study of the conidial state of powdery mildew of *Lycium chinense* in New Zealand indicates that it cannot be classified in *Microsphaera* as in common practice but that it belongs in *Erysiphe*. A study of the type material in Paris, which includes both the imperfect and the perfect state, confirms that the New Zealand collection is identical with *Microsphaera mougeotii* and confirms DE BARY's statement that LÉVEILLÉ did not provide an adequate drawing of the perithecia. The characteristics of the perithecial appendages and two-spored asci do not belong in *Microsphaera* but fit *Erysiphe*. There is no need to create a new genus to accommodate this powdery mildew on *Lycium* and until further progress has been made with the classification of Erysiphaceae this species should be called *E. mougeotii* (Lév.) de By.

RÉSUMÉ. -- L'étude des stades imparfaits et parfaits du type de *Microsphaera mougeotii* Lév. du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, confirme que la collection néo-zélandaise sur *Lycium chinense* représente le stade conidien de *M. mougeotii*. Cette étude confirme aussi l'opinion de DE BARY selon laquelle le dessin des périthèces, par LÉVEILLÉ, est totalement insuffisant. Les caractéristiques du stade parfait, surtout des fulcres nombreux et des asques bispores, font appartenir l'échantillon plutôt au genre *Erysiphe* qu'au genre *Microsphaera*.

L'étude du stade conidien en Nouvelle-Zélande montre que sa classification habituelle dans le genre *Microsphaera* n'est pas appropriée en raison de la production de conidies en chaînes et de la présence de suçoirs arrondis, non lobés. Cependant, ces caractéristiques sont conformes au genre *Erysiphe*. Comme les deux stades, parfaits et imparfaits, appartiennent au genre *Erysiphe*, la création récente du genre *Arthrocladiella* pour l'espèce sur *Lycium* est inutile. Confirmant l'opinion de DE BARY, l'auteur conserve pour cette espèce cosmopolite, le nom de *E. mougeotii* (Lév.) de By.

* Plant Health Diagnostic Station, Mt Albert Research Centre, Private Bag, Auckland, New Zealand.

INTRODUCTION

The name *Microsphaera mougeotii* Lév. is frequently applied to a species of powdery mildew on *Lycium barbarum* L., *L. europaeum* L. (LÉVEILLÉ, 1851), *L. ovatum* Poir., *L. ruthenicum* Murr. (SALMON, 1900), *L. chinense* Mill. (YEN and WANG, 1973) and *L. rhombifolium* (BLUMER, 1933, 1967). Its classification within *Microsphaera* is not justified as it is based only on the characteristics of the perithecial appendages which are not at all typical of that genus. SALMON (1900) remarked that *M. mougeotii* differed from all other species of the genus *Microsphaera* in the densely crowded, widely branched appendages and the possession of two-spored asci. GOLOVIN (1956) placed the fungus in *Arthrocladia* and mentioned that the appendages were branched regularly with septa at the nodes reminiscent of *Penicillium* or *Cladophora* conidiophores. VASSILKOV (1960) considered that the appendages were articulate and so different from *Microsphaera* that he proposed the new genus *Arthrocladiella* with the only species *A. lycii* (Lasch) Vassilk. In 1963 VASSILKOV changed the name into *A. mougeotii* (Lév.) Vassilk. VASSILKOV did not describe or illustrate the conidial state or the appendages which, according to DE BARY (1870), are more densely crowded than on the illustration by LÉVEILLÉ in 1851. Classification of Erysiphaceae is based on the morphology of the perithecia and those of *M. mougeotii*, which were frequently found before the time of DE BARY, have been rare during the last 100 years (DE BARY, 1870; BLUMER, 1967). However, DE BARY (1870) noted that this species on *Lycium*, which he referred to as *Erysiphe mougeotii*, can be recognised by the well developed mycelium, the typically unlobed appressoria and the short cylindrical conidia. While many plants are host to several species of powdery mildew of which the imperfect states have been confused because their characteristics are not well known, it is difficult to mistake *E. mougeotii* which is well characterised by the features mentioned by DE BARY.

Although *Lycium* can be infected also by *M. diffusa* Cooke & Peck (SALMON, 1900) and *Sphaerotheca pannosa* (Wallr. ex Schlecht.) Lév. (Anonymous, 1960), their imperfect states are different. *M. diffusa* has lobed appressoria and larger, singly produced conidia whereas *S. pannosa* has longer chains of ovoid conidia which contain conspicuous fibrosin bodies.

RESULTS AND DISCUSSION

The imperfect conidial state on *Lycium chinense* in New Zealand (fig. 1) possesses the characteristics described and illustrated by DE BARY (BOESEWINKEL, 1979). The dense, white, amphigenous mycelium produces numerous unlobed, nipple-shaped, appressoria of 5-7 μm wide. The conidiophores of 55-125 x 7.5-12 μm produce conidia of a characteristic shape and size in long or short chains. The conidia are oblong-cylindric with nearly flattened ends, less frequently ovoid or barrel-shaped, and measure (20-) 27.5 (-38) x (10-) 13.7



Fig. 1. - Conidiophore of *E. mougeotii* on *Lycium chinense* in New Zealand, x 600.

(-19)μm. No conspicuous fibrosin bodies are present but occasionnally granular bodies up to 1μm diameter can be observed. Germ tubes are produced at the ends, less frequently at the sides of conidia and terminate in an unlobed appressorium. There have been few illustrations or descriptions of the imperfect state since DE BARY (1870). FOEX (1925) studied 3-5 celled conidiophores and conidial germination on *L. barbarum* in France. HOMMA (1937) remarked that the numerous collections on *L. chinense* in Japan produced conidia in perfect chains, according to which the fungus belonged in *Erysiphe* rather than in *Microsphaera*. JORSTAD (1962) mentioned that on *L. europaeum* in the Canarian Islands the conidia are produced in a chain and the same observation was made on *L. chinense* in Formosa (YEN and WANG, 1973). To remove any doubt whether the imperfect state in New Zealand belongs to *M. mougeotii* Lév. and to verify DE BARY's statement that LÉVEILLÉ provided an inadequate illustration, I studied the type material on *L. europaeum* L. which LÉVEILLÉ collected in 1848 in Vaugirard, France and which is held in Paris. Furthermore I examined a range of samples from France and Germany identified by DE BARY, MAGNUS, TULASNE, HARIOT and others. The perithecial characteristics of the type were in good condition and not entirely like the illustration given by LÉVEILLÉ (1851) but in agreement with the

description by DE BARY (1870) and nearly like the illustration by BLUMER (1933) (fig. 2). The perithecia are globose with a flattened base, 100-160μm wide and 100-110μm high. The outer cells of the perithecial wall are 10-15μm wide. From the upper half of the perithecia 50 or more appendages arise which

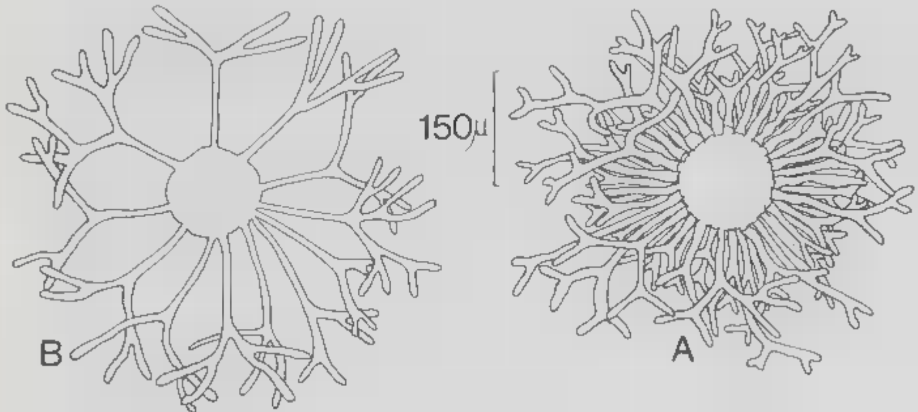


Fig. 2. — A: Perithecia drawn from the type; B: after LÉVEILLÉ.

are septate at the base, hyaline, thin-walled and 1-3, rarely 4 times dichotomously branched at about half way their length. For some unexplained reason, LÉVEILLÉ drew only 12 appendages. Their width was found to be greater than suggested by the illustration of BLUMER as they are 5-7.5μm wide with occasional swollen areas of 7-8.7μm wide (fig. 3). The perithecia contain about

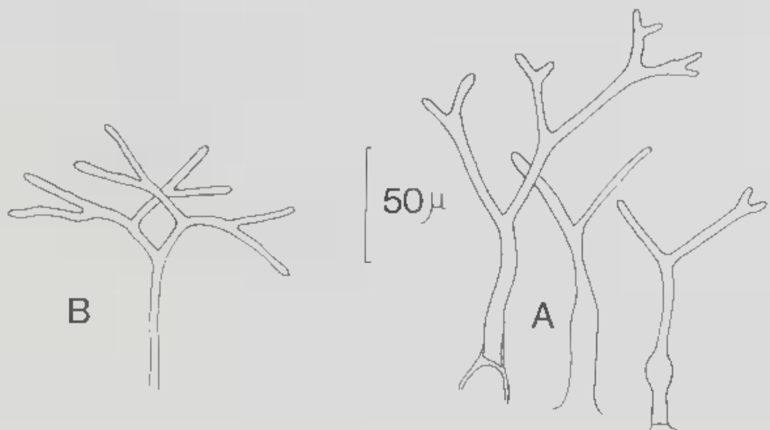


Fig. 3. — A: Appendages drawn from the type; B: after LÉVEILLÉ.

12-20 asci which produce 2 ascospores. The conidial state of the type was in good condition and possessed mycelial cells of (25-) 37-50µm long with unlobed nipple-shaped appressoria, conidiophores producing conidia in long or short chains and characteristic cylindrical conidia of 20-35 x 10-12.5µm. These typically shaped conidiophores of the type are identical to those present in New Zealand (fig. 1) but cannot be recognised from the illustrations by FOEX (1925) and YEN and WANG (1973). It is obviously difficult to draw the subtle morphological features of the imperfect state.

According to the characteristics of the perfect state the species on *Lycium* apparently does not belong in the genus *Microsphaera* where perithecia usually contain fewer than 12 asci, more than 2 ascospores and where the not very numerous appendages are branched, and often typically broadened near the tip. The characteristics of the perfect state of *M. mougeotii* occur, however, in the genus *Erysiphe*.

Although usually only the perfect state is used in classification of powdery mildews, the imperfect states of typical representatives of a genus often have characteristics in common which may be help in identification. Lobed appressoria and singly produced conidia are characteristics commonly found in species of *Microsphaera* (BOESEWINKEL, 1976). As the appressoria of *M. mougeotii* are never lobed (DE BARY, 1870; YEN & WANG, 1973) and the conidia often formed in long chains (YEN & WANG, 1973) it also differs in this respect from species of *Microsphaera* but is similar to several species of *Erysiphe*. According to the characteristics of both the imperfect and perfect states, powdery mildew of *Lycium* should be placed in *Erysiphe*, the appropriate name being :

Erysiphe mougeotii (Lév.) de By, Abh. Senckenb. naturf. Ges. 7 : 412, 1870.
= *Erysiphe lycii* Lasch, Klotzsch Herb. myc. 950, 1846 (nomen nudum).
= *Microsphaera mougeotii* Lév., *Ann. Sci. Nat.*, bot. 3 sér., 15: 158 and 381, 1851.
= *Podosphaera mougeotii* (Lév.) Quél., *Champ. Jur. Vosg*. 3: 106, 1875.
= *Microsphaera lycii* (Lasch) Sacc. & Roum., *Michelia* 2: 310, 1881.
= *Arthrocladia lycii* (Lasch) Golov., *Pl. crypt*. 10: 310, 1956.
= *Arthrocladiella mougeotii* (Lév.) Vassilk., *Bot. mater. otd. spor. rast*. 16: 112, 1963.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to the curator of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, for providing the type specimen and other collections; and to the curator of the Botanischen Museum, Berlin Dahlem, for additional samples of *E. mougeotii*.

REFERENCES

ANONYME, 1960 — Index of plant diseases in the United States. U.S. Government Printing Office, Washington, 531 p.

DE BARY A., 1870 — *Eurotium, Erysiphe, Cicinnobolus,* nebst Bemerkungen über die Geschlechtsorgane der Ascomyceten. *Abh. senckenb. naturforsch. Ges.* 7 : 361-455.

BLUMER S., 1933 — Die Erysiphaceen Mitteleuropas mit besonderer Berücksichtigung der Schweiz. *Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz*, 483 p.

BLUMER S., 1967 — Echte Mehltaupilze (Erysiphaceae), Jena : Verlag Gustav Fischer, 436 p.

BOESEWINKEL H.J., 1976 — Powdery mildew of *Begonia. Trans. Br. Mycol. Soc.* 67 : 152-155.

BOESEWINKEL H.J., 1979 — Erysiphaceae of New Zealand. *Sydowia* 32 (in press).

FOEX E.M., 1925 — Notes sur quelques Erysiphacées. *Bull. Soc. mycol. Fr.* 41 : 417-438.

GOLOVIN P.N., 1956 — Material for a monograph of the parasitic fungi (family Erysiphaceae) in U.S.S.R. *Trans. V. L. Komarov Bot. Inst. U.S.S.R., Acad. Sci.*, Ser. II, 10, (Pl. Crypt.) : 309-366. (Abstr. ex RAM 37, p. 400).

HOMMA Y., 1937 — Erysiphaceae of Japan. *J. Fac. Agr. Hokkaido (imp.) Univ.* 38: 188-461.

JORSTAD I., 1962 — Parasitic micromycetes from the Canary Islands. Oslo University Press, 71 p.

LÉVEILLÉ J.H., 1851 — Organisation et disposition méthodique des espèces qui composent le genre *Erysiphe. Annales des sciences naturelles 3e Série*, 15: 105-179 + p. 317.

SALMON E.S., 1900 — A monograph of the Erysiphaceae. *Mem. Torrey Bot. Club.* 9, 292 p.

VASSILKOV B.P., 1960 — Kritika i bibliographir (In Russian). *Bot. Zhurnal* 45 : 1366-1372.

VASSILKOV B.P., 1963 — De mutatione nominis fungi *Arthrocladiella lycii. Bot. mater. otd. spor. rast.* 16 : 112-113.

Contribution à l'étude de CONIDIOBOLUS OSMODES Dreschler (Zygomycètes ENTOMOPHTHORACEAE) agent occasionnel d'Epizooties chez les Pucerons (Homoptères APHIDIDAE)

par B. PAPIEROK* et J. COREMANS-PELSENEER**

RÉSUMÉ. - L'Entomophthorale *Conidiobolus osmodes* a été trouvée responsable d'une épizootie dans une population du Puceron *Macrosiphoniella oblonga* évoluant sur Chrysanthème cultivé, sous tunnel de film plastique. Une des souches de ce champignon isolées du sol quatre mois après la disparition des pucerons se révèle particulièrement entomopathogène au laboratoire.

SUMMARY. – The fungus *Conidiobolus osmodes* (Zygomycetes *Entomophthoraceae*) caused an epizootic in a population of *Macrosiphoniella oblonga* on chrysanthemums in a polythene tunnel. One of the strains of this fungus isolated from the soil four months later is pathogenic for insects in the laboratory.

Isolé à l'origine de plantes en décomposition (1954), le champignon Zygomycète *Conidiobolus osmodes* Dreschler a été retrouvé dans le sol : échantillon de terre du littoral de la Somme, France, échantillons de terre provenant de champs cultivés à Milmort et Villiers-l'Évêque, Belgique (COREMANS-PELSENEER, 1978).

De plus, *C. osmodes* a été isolé, à plusieurs reprises, d'Homoptères *Aphididae* en France. Les essais d'infection expérimentale réalisés alors sur les Aphides *Sitobion avenae* F. et *Myzus persicae* Sulz. donnèrent une mortalité par mycose de l'ordre de 1%, confirmant ainsi l'existence d'un pouvoir entomopathogène

* Unité de Lutte biologique contre les Insectes, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, F 75724 Paris Cedex 15.

** Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine, Université libre de Bruxelles, 115, boulevard de Waterloo, B 1000 Bruxelles.

chez ce champignon (REMAUDIERE et al., 1976 b). Par la suite des taux de mycose allant jusqu'à 20% étaient obtenus chez les Pucerons *Metopolophium dirhodum* Wlk. soumis à l'infection.

La découverte sur Chrysanthème cultivé *(Chrysanthemum indicum)*, en novembre 1976, d'un grand nombre d'individus de *Macrosiphoniella oblonga* Mordv. (Homoptères *Aphididae*) tués par *C. osmodes* nous a amenés à préciser les caractéristiques de la mycose et à rechercher le champignon dans le sol une fois l'insecte-hôte disparu.

OBSERVATIONS ET RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. Caractéristiques de l'épizootie à *Conidiobolus osmodes*

Les observations ont été réalisées en 1976 à Dechy (Nord) dans une parcelle de chrysanthèmes cultivés de 7,50 m de longueur sur 4,60 m de largeur. Les plants avaient été repiqués en pleine terre début mai et, dès la fin septembre, un film plastique avait été tendu à une hauteur de 1 m au-dessus de la parcelle afin de protéger les plants du vent et des premières gelées. En cas de beau temps, le film plastique était ôté dans le courant de la matinée et replacé en fin d'après-midi.

Au mois d'octobre, une forte pullulation de *Macrosiphoniella oblonga* est constatée sur les chrysanthèmes. *M. oblonga* étant inféodée à *Artemisia vulgaris*, sa présence sur *C. indicum* est tout à fait exceptionnelle, d'autant plus qu'aucun plant d'armoise n'a été observé aux alentours de la parcelle. On pourrait trouver sur *C. indicum* une espèce voisine, *Macrosiphoniella persequens* Wlk., qui vit normalement sur *Chrysanthemum (Tanacetum) vulgare*.

Le 1er novembre, on remarque de nombreux cadavres de *M. oblonga* fixés par le rostre, le plus souvent à la face inférieure des feuilles. Tous présentent les caractéristiques d'une mycose à Entomophthorale. Certains spécimens, de couleur brun grisâtre, sont desséchés mais la majorité, d'une couleur brun brillant et ayant conservé leur forme, semblent de mort récente. Aucun rhizoïde n'est observé.

A l'intérieur des pucerons morts, on note la présence de nombreuses spores de résistance à paroi très épaisse avec l'épispore finement cannelée ondulée (diamètre moyen: 26µm; extrêmes : 19,2-33,6µm) (fig. 1). Des corps hyphaux sont également observés dans certains cadavres. A la surface des pucerons fraîchement tués, placés sur de la cellulose mouillée, apparaissent au bout de quelques heures des conidiophores donnant naissance à des conidies piriformes avec une papille basale arrondie (diamètre moyen : 25µm; extrêmes, 16,0-35,2µm) (fig. 2). Les souches fongiques isolées suivant la technique décrite par REMAUDIERE et al. (1976 a) poussent rapidement, plissent fortement le milieu et exhalent une odeur caractéristique. L'agent pathogène est identifié comme étant *Conidiobolus osmodes*.

A la mi-novembre, la population de *M. oblonga* a pratiquement disparu;

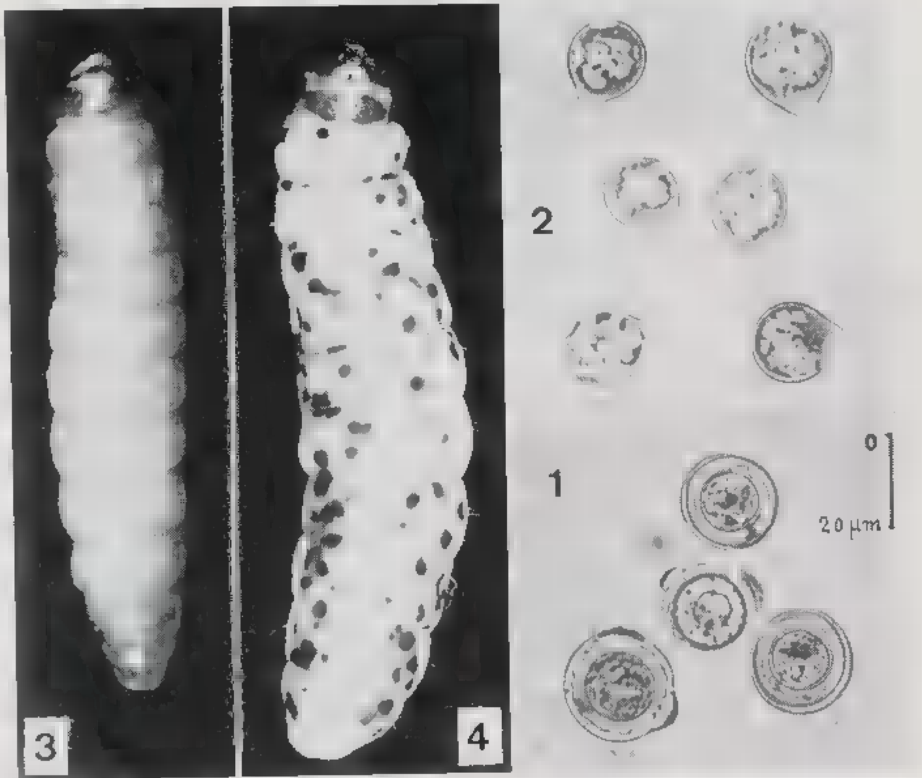


Fig. 1. - Spores de résistance de *Conidiobolus osmodes* Dreschler. — Fig. 2. - Conidies de *C. osmodes*. - Fig. 3. - Chenille saine de *Galleria mellonella*. — Fig. 4. - Aspect de la chenille de *G. mellonella* 12 h après l'infection par *C. osmodes*.

seuls subsistent les œufs pondus par les femelles ovipares épargnées par le champignon. A ce propos, on peut remarquer qu'à l'intérieur des femelles ovipares d'Aphides tuées par une Entomophthorale, les œufs ne sont pas envahis par le mycélium.

2. Isolement de *Conidiobolus osmodes* à partir du sol

La méthode d'isolement d'Entomophthorales à partir d'échantillons de sol a déjà été décrite dans le cas de *Basidiobolus* Eidam (COREMANS-PELSENEER, 1974). Une modification a cependant été introduite : la température d'incubation des boites de Pétri est de 16°C au lieu de 25°C. Les contrôles sont effectués 4, 7, 14 et 21 jours après l'ensemencement.

La méthode a été appliquée à plusieurs séries d'échantillons de sols prélevés

à différentes reprises après la disparition des pucerons : 19 échantillons prélevés au total en février 1977 (dont 7 à l'extérieur de la parcelle), 8 en août et décembre 1977 ainsi qu'en mai 1978 (dont 2 à l'extérieur de la parcelle).

Les résultats d'ensemble sont donnés dans le tableau I. Ils révèlent 4 mois après l'épizootie la présence de *C. osmodes* dans 3 emplacements à l'intérieur de la parcelle. Par la suite cette Entomophthorale n'a plus été retrouvée.

Tableau I

Isolement d'Entomophthorales à partir d'échantillons de sol prélevés à l'intérieur et à l'extérieur d'une parcelle couverte ayant supporté des chrysanthèmes cultivés sur lesquels une population de *Macrosiphoniella oblonga* avait été décimée par *Conidiobolus osmodes* en novembre 1976 (Dechy, Nord).

Date du prélèvement et nombre de boîtes de Pétri ensemencées par échantillon	Intérieur de la serre		Extérieur de la serre	
	Nb d'échantillons	Entomophthorales isolées	Nb d'échantillons	Entomophthorales isolées
février 1977 13 boîtes	12	3 C. osmodes 6 Conidiobolus spp. 1 B. ranarum EID.	7	5 Conidiobolus spp. 1 Entomophthora?sp.
août 1977 8 boîtes	6	4 Conidiobolus spp.	[illegible]	3 Conidiobolus spp.
décembre 1977 8 boîtes	6	3 Conidiobolus spp.	2	2 Conidiobolus spp.
mars 1978 20 boîtes	[illegible]	6 Conidiobolus spp. 1 Entomophthora? sp.	2	[illegible] Conidiobolus spp.

B. ranarum = *Basidiobolus ranarum* Eid.

3. Infection expérimentale d'Insectes avec les souches de *Conidiobolus osmodes* isolées du sol.

L'action pathogène des 3 souches de *C. osmodes* isolées du sol (No 1048, 1049 et 1050 de la mycothèque de l'Unité de Lutte biologique contre les Insectes de l'Institut Pasteur de Paris*) a été recherchée vis-à-vis du Puceron *Acyrthosiphon pisum* Harr. et vis-à-vis des chenilles de *Galleria mellonella* L. (Lépidoptères *Pyralididae*). Les deux souches No 1049 et 1050 produisant très

* Respectivement No 3150, 3156 et 3153 de la mycothèque du Laboratoire de Parasitologie de l'Université libre de Bruxelles.

peu de conidies dans nos conditions expérimentales, les résultats donnés ci-dessous ne concernent que la souche No 1048.

La méthode d'estimation du pouvoir pathogène vis-à-vis de *A. pisum* (clone B) a été décrite récemment (PAPIEROK et WILDING, 1979). Les essais d'infection ont été réalisés simultanément avec une souche de *Entomophthora obscura* Hall et Dunn (No 542) sur des adultes ailés, 4 fois 5 lots de 10 pucerons étant exposés au flux des conidies émises par des cultures durant respectivement 5, 20, 80 et 320 mn. *Conidiobolus osmodes* se révèle particulièrement virulent à l'égard de *A. pisum*; la CL 50 est de 12,8 conidies/mm^2 (68,2 conidies/mm^2 dans le cas de *E. obscura*; tableau II). La mortalité est effective dès la fin du séjour des pucerons en atmosphère saturée, c'est-à-dire 29 h 20 mn après le début de l'exposition aux conidies. Au moment de la mort, le puceron conserve sa forme et sa couleur et il n'héberge pas encore de corps hyphaux. Nous n'avons noté aucune formation de rhizoïde. Le développement du champignon dans l'hôte a lieu *post mortem*, il est également limité à la tête et au thorax.

Tableau II

Concentrations létales 50 (CL 50) d'une souche de *Conidiobolus osmodes* (No 1048) isolée du sol et d'une souche de *Entomophthora obscura* (No 542) vis-à-vis de *Acyrthosiphon pisum*

champignon	CL [illegible] conidies/mm^2	Limites de l'intervalle de confiance (avec [illegible] probabilité [illegible] 95 %)	χ^2	degrés de liberté	Pente de la droite de régression	écart-type
Conidiobolus osmodes	12,8	9,0 - 17,[illegible]	21,3	18	1,49	0,17
Entomophthora obscura	68,2	39,4 - [illegible]	19,6	18	1,06	0,22

au point 5 %, χ^2 = 28,9 avec 18 degrés de liberté.

Sur les chenilles de *G. mellonella* soumises à l'infection par les conidies de *C. osmodes* selon la technique de KREJZOVA (1971), on note au bout de quelques heures l'apparition de taches de mélanisation très nombreuses et très intenses (fig. 3 et 4). Les chenilles infectées meurent en 24 h à 48 h. Au moment de la mort, comme dans le cas de l'infection de *A. pisum*, on n'observe pratiquement pas de développement mycélien à l'intérieur de l'insecte. Les cadavres noircissent rapidement, se dessèchent pour former finalement un «sclérote» colonisé par le champignon. Jusqu'à présent l'étude du pouvoir pathogène sur *G. mellonella* n'a pas été abordée au plan quantitatif.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Conidiobolus osmodes, espèce originellement décrite comme saprophyte mais dont REMAUDIERE et al. (1976 b) ont mis en évidence l'action pathogène

vis-à-vis des Pucerons, est capable d'entraîner des épizooties dans les populations aphidiennes. Cette espèce peut donc se comporter dans certaines conditions (forte humidité notamment) comme un agent pathogène primaire. Sa rapidité d'action vis-à-vis des Insectes suggère l'intervention de substances toxiques émises au moment de l'infection et entraînant la mort de l'hôte avant même que le mycélium se développe. Le comportement pathogène de *C. osmodes* peut être rapproché de celui de certaines Entomophthorales telles que *Entomophthora virulenta* Hall et Dunn et *Entomophthora apiculata* Thaxt., dont les toxines ont été étudiées par plusieurs auteurs (YENDOL et al., 1968; PRASERTPHON et TANADA, 1969). CLAYDON et GROVE (1978) ont montré récemment que *E. virulenta* produit au moins deux substances toxiques pour les insectes; ils en ont déterminé la nature chimique. Il est intéressant de remarquer que, chez la plupart des Fungi Imperfecti pathogènes d'Insectes, les toxines jouent un rôle essentiel dans le processus infectieux, le champignon se développant en saprophyte aux dépens du cadavre de l'Insecte (FERRON, 1978). En revanche, la mort des pucerons infectés par *Entomophthora obscura*, *E. aphidis* Hofmann ou *E. planchoniana* Cornu, intervient seulement après le total envahissement de l'hôte par le champignon : 2 à 4 jours pour la souche No 542 de *E. obscura* (PAPIEROK et WILDING, 1980).

Nous avons montré par ailleurs que *Conidiobolus osmodes* se maintient dans le sol pendant la mauvaise saison, sous une forme non déterminée (probablement à l'état de zygospores) et qu'il conserve intacte sa potentialité entomopathogène. Le rôle du sol dans la conservation des Entomophthorales pathogènes d'Aphides a été particulièrement souligné par GUSTAFSSON (1969). LATTEUR (1977) a montré que la terre provenant d'un champ ayant supporté une culture sur laquelle une population aphidienne avait été décimée par *Entomophthora aphidis* et *E. obscura*, constitue une source d'infection pour les pucerons venant à son contact. Des pourcentages élevés de germination des azygospores de *E. obscura* ont été obtenus par LATGE et al. (1978) après stockage dans le sol pendant l'hiver. Le sol, qui est capable d'assurer la perennité de l'inoculum, joue donc probablement un rôle important dans le déclenchement et le déroulement de l'entomophthorose.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur reconnaissance à Monsieur et Madame A. TILMANT pour toutes les facilités qu'ils leur ont accordées dans la conduite des observations et des prélèvements sur le terrain, à Messieurs J. FARGUES et P.H. ROBERT (INRA, La Minière) pour la fourniture des chenilles de *Galleria mellonella* nécessaires aux expériences d'infection et à Monsieur N. WILDING (Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Grande-Bretagne) pour son aide dans l'analyse statistique des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

CLAYDON N. & GROVE J.F., 1978 – Metabolic products of *Entomophthora virulenta*. *J.C.S. Perkin* I, 2 : 171-173.

COREMANS-PELSENEER J., 1974 – Biologie des champignons du genre *Basidiobolus* Eidam 1886. Saprophytisme et pouvoir pathogène. *Acta Zool. Pathol. Antverp.* 60 : 1-143.

COREMANS-PELSENEER J., 1978 – Some Entomophthorales isolated from soil in Belgium. Abstracts XIth Meeting Society Invertebrate Pathology, Prague : 139.

DRESCHLER C., 1954 – Two species of *Conidiobolus* with minutely ridged zygospores. *Am. J. Bot.* 41 : 567-575.

FERRON P., 1978 – Biological control of Insect Pests by Entomogenous Fungi. *Ann. Rev. Entomol.* 23 : 409-442.

GUSTAFSSON M., 1969 – On species of the genus *Entomophthora* Fres. in Sweden. III. Possibility of usage in biological control. *Lantbrukshögsk. Ann.* 35 : 235-274.

KREJZOVA R., 1971 – Versuchsinfektionen der Raupen von *Galleria mellonella* L. und *Antheraea pernyi* L. durch Vertreter der *Entomophthora*-Gattung. II. *Vest. Cs. spol. zool.* 35 : 114-117.

LATGE J.P., PERRY D., PAPIEROK B., COREMANS-PELSENEER J., REMAUDIERE G. et REISINGER O., 1978 – Germination des azygospores d'*Entomophthora obscura* Hall et Dunn, rôle du sol. *C. R. Acad. Sci. Paris, série D*, 287 : 943-946.

LATTEUR G., 1977 – Sur la possibilité d'infection directe d'Aphides par *Entomophthora* à partir de sols hébergeant un inoculum naturel. *C. R. Acad. Sci. Paris, série D*, 284 : 2253-2256.

PAPIEROK B. et WILDING N., 1979 – Mise en évidence d'une différence de sensibilité entre 2 clones du Puceron du Pois, *Acyrthosiphon pisum* Harr. (Homoptères *Aphididae*) exposés à 2 souches du champignon zygomycète *Entomophthora obscura* Hall et Dunn. *C. R. Acad. Sci. Paris, série D*, 288 : 93-95.

PAPIEROK B. et WILDING N., 1980 – Étude du comportement de plusieurs souches de *Entomophthora obscura* Hall et Dunn (Zygomycètes *Entomophthoraceae*) vis-à-vis des Pucerons *Acyrthosiphon pisum* Harr. et *Sitobion avenae* F. (Homoptères *Aphididae*) (en préparation).

PRASERTPHON S. et TANADA Y., 1969 – Mycotoxins of entomophthoraceous fungi. *Hilgardia*, 39 : 581-600.

REMAUDIERE G., KELLER S., PAPIEROK B. et LATGE J.P., 1976 a – Considérations systématiques et biologiques sur quelques espèces d'*Entomophthora* du groupe *sphaerosperma* pathogènes d'insectes (Zygomycètes, *Entomophthoraceae*). *Entomophaga* 21 : 163-177.

REMAUDIERE G., LATGE J.P., PAPIEROK B. et COREMANS-PELSENEER J., 1976 b – Sur le pouvoir pathogène de quatre espèces d'Entomophthorales occasionnellement isolées d'Aphides en France. *C. R. Acad. Sci. Paris, série D*, 283 : 1065-1068.

YENDOL W.G., MILLER E.M. et BEHNKE C.N., 1968 – Toxic substances from entomophthoraceous fungi. *J. Invertebr. Pathol.* 10 : 313-319.

VARIABILITÉ DE LA FRUCTIFICATION DU PLEUROTUS ERYNGII EN CULTURE

par R. CAILLEUX, A. DIOP, A.M. SLEZEC et P. JOLY*

RÉSUMÉ. – On observe en culture artificielle une variabilité du taux de fertilité des souches et de la morphologie de leurs basidiocarpes lorsqu'elles sont pleinement fertiles. Cette variabilité s'exprime, dans les deux cas, avec des amplitudes plus ou moins grandes selon les populations naturelles dont sont extraites les souches. En outre, le taux de fertilité observé chez un ensemble de souches n'est pas indépendant des modalités de leur isolement à partir de la population sauvage : il est plus faible chez celles issues de semis plurispore que chez celles provenant de bouturages, à la suite d'un accroissement des taux d'expressions d'un ou plusieurs types de blocages de la fructification. On ne peut pas rejeter l'hypothèse d'une intervention, à ce niveau, de recombinaisons méiotiques au cours de la formation des basidiospores mais, dans ce cas, la manifestation de blocage résulterait de processus plus complexes qu'une simple expression de phénotype monogénique récessif.

Étroitement inféodé au Panicaut (*Eryngium campestre* L.) sur les racines mortes duquel il développe ses fructifications, le *Pleurotus eryngii* (Fr. ex DC.) Quél. a, en Europe occidentale du moins, une aire de répartition qui recouvre sensiblement celle de son hôte, telle qu'elle a été précisée par TURMEL (1948). Vers le sud, il atteint l'Afrique du nord (Maroc, Algérie, Tunisie) où il accompagne pratiquement le Panicaut à sa limite méridionale extrême. Vers le nord, il remonte jusqu'aux Pays-Bas, mais sa limite d'extension reste là nettement en deçà de celle de son hôte qui s'étend au sud de la Grande-Bretagne et au Jutland.

Sa présence n'est toutefois pas uniforme dans cette aire, mais fragmentée en stations de dimensions assez restreintes, relativement stables dans l'espace et dans le temps et souvent isolées les unes des autres. Ce morcellement géogra-

* Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle, L. A. N° 257 (C.N.R.S.), 12 rue de Buffon, 75005 Paris.

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE *(Cryptog. mycol.)* Tome 1 (1980).

phique est dû, en partie déjà, aux nombreuses discontinuités de l'aire du Panicaut qui découlent de ses exigences écologiques : c'est une plante de dunes fixées, de pelouses ou de côteaux secs, ne dépassant guère 1500m d'altitude dans nos régions. Ce morcellement est accru par le fait que, là où existent d'assez vastes étendues peuplées d'*E. campestre*, les stations du Pleurote restent localisées et séparées par des zones dans lesquelles les Panicauts demeurent indemnes.

Une telle disjonction en petites localités stables s'accompagne naturellement de différences plus ou moins importantes dans le déroulement des processus de fructification et dans les faciès des basidiocarpes, tant en milieu naturel qu'au sein de souches extraites des diverses populations et cultivées en conditions uniformisées. Maîtrisant bien, maintenant, le cycle complet et la reproductibilité des cultures de ce champignon (CAILLEUX et DIOP, 1976; 1978), il devenait possible d'étudier cette variabilité des comportements entre populations distinctes. Pour cela, nous avons disposé d'un ensemble de souches prélevées au sein de populations d'origines géographiques variées : Manche, Finistère, Vallée de la Loire (Montrichard et Beaugency), Saône-et-Loire (environs de Tournus), Vaucluse (Roaix et Malaucène), Bouches-du-Rhône (Châteaurenard et Massif de la Sainte-Baume) et Aveyron (environs de Millau).

Originellement, toutes ces souches sont des «souches brutes», obtenues directement par des isolements de routine selon l'un ou l'autre des quatre procédés les plus couramment utilisés : semis multispore (mélange de spores haploïdes), boutures de fragments d'hyménophore (mélange de spores haploïdes et d'hyphes du dicaryon sauvage parental), de fragments de la chair du basidiocarpe ou de la racine du Panicaut infectée naturellement (hyphes du dicaryon sauvage). Par opposition, nous dénommons «souches contrôlées» celles qui résultent de la fusion de deux haplontes issus chacun d'une basidiospore, sauvage ou produite par une «souche brute», en culture.

Cette étude de la variabilité de la fertilité des souches et de la morphologie des basidiocarpes a été réalisée à partir de 206 «souches brutes», qui ont été conduites jusqu'à la fructification complète ou à l'expression de divers blocages. Ces souches provenaient de neuf des dix populations citées (celle de Millau n'étant pas incluse ici), représentées chacune par divers prélèvements réalisés par des semis multispores et, chaque fois que celà a été possible, compte-tenu du matériel de départ, un ou plusieurs types de bouturages.

Deux variables ont donc été introduites simultanément dans ce travail : une variable de populations (origine géographique) et une variable d'échantillonnage au sein de chaque population (modalité d'isolement des souches). Avant d'entreprendre l'étude du comportement des diverses populations, il importait donc de voir, systématiquement, si les modalités de prélèvement des échantillons, c'est-à-dire d'isolement des souches, exerçait ou non une influence sur l'expression de la variabilité du développement basidiocarpique.

Enfin, parmi l'ensemble des données expérimentales, certaines constituent en réalité des répétitions: outre des duplications de «souches brutes» (286

cultures réalisées pour 206 «souches brutes»), il faut tenir compte du fait qu'à partir des basidiocarpes, ou couple basidiocarpe + racine infectée, il a souvent, mais pas toujours, été effectué divers isolements par une ou plusieurs modalités distinctes. On peut alors craindre que le poids qui leur est affecté, dans les données originelles, puisse déformer quelque peu l'analyse; d'autre part, les éliminer constituerait une perte d'information. Pour en tenir compte, sans pour autant leur accorder un poids excessif, nous avons effectué des analyses en utilisant la formule :

$$i = \Sigma 1 + \frac{1}{2} + \frac{1}{3} + \ldots . \frac{1}{n}$$

i étant l'indice affecté à chaque basidiocarpe, ou couple basiciocarpe + racine infectée, compte-tenu des n isolements répétitifs qu'il a fournis. Chaque fois que, parmi ces n répétitions, il existe plusieurs modalités d'isolements ou des extériorisations de comportements distincts le partage est fait proportionnellement aux nombres des répétitions de chaque sous-groupe.

VARIABILITÉ DES TAUX DE FERTILITÉ

Les résultats des essais culturaux concernant les 286 cultures, en données originelles et en données pondérées en fonction des répétitions, sont réunis dans le tableau I dont la simple lecture montre un taux de fertilité beaucoup plus faible dans le cas des semis multispores que dans celui des trois types de bouturages. Il est aisé de le confirmer par un test de x^2. Pour les données

Modalités d'isolement	Données originelles			Données pondérées		
	Présence de blocage	Fructification normale	Total	Présence de blocage	Fructification normale	Total
Multispore	55	109	164	34,16	52,83	86,99
Chair	4	45	49	1,78	24,70	26,48
Racine	0	21	21			
Hyménophore	2	50	52	1,26	27,39	28,65
Total	61	225	286	37,20	104,92	142,02

Tab. I. – Comportement fructifère en fonction des modalités d'isolement des «souches brutes».

originelles, ce test indique une très forte hétérogénéité du comportement fructifère en fonction des modalités d'isolement (x^2 = 27,53**). Si l'on effectue alors les comparaisons élémentaires, on constate qu'effectivement les cultures issues des semis multispores se différencient nettement et à la fois de celles qui sont issues des fragments d'hyménophore (x^2 = 17,90**), des fragments de chair du basidiocarpe (x^2 = 12,12**) et des fragments de racines infectées (x^2 = 10,01**). En ce qui concerne les comparaisons élémentaires entre les trois types de bouturages, il n'est pas possible, en raison des faibles taux d'apparition de blocages, de discerner des différences de comportements; le test de x^2, d'ailleurs, n'est pas applicable en raison des valeurs trop faibles, dans ces comparaisons élémentaires, des taux de blocage calculés à partir des totaux marginaux.

Avec les données pondérées pour les répétitions et en regroupant, pour simplifier, les souches issues des seuls dicaryons sauvages, c'est-à-dire les boutures de fragments de chair et de racines infectées, on retrouve la très forte hétérogénéité de comportements (x^2 = 19,90**) et les souches provenant des semis multispores se distinguent encore nettement des souches obtenues par des boutures d'hyménophore (x^2 = 12,34**) ou de chair et racines infectées (x^2 = 9,93**). Les semis multispores engendrent donc des cultures dont le taux de fertilité, par suite d'un fort accroissement de l'apparition de blocages, est nettement inférieur (0,607 à 0,665 selon que l'on utilise les données originelles ou les données pondérées) à celui des trois autres modes d'isolements (0,945 à 0,951).

Si l'on examine maintenant la variabilité entre des populations d'origines géographiques distinctes, il nous faut traiter séparément celles qui ont été prélevées par des bouturages et celles issues des semis multispores. Pour les premières, les blocages de la fructification sont rares : seules les souches issues de deux stations en ont exprimé; quatre provenaient de Montrichard et deux de Tournus. Ce sont d'ailleurs les deux stations pour lesquelles nous avons pu disposer du plus grand nombre de données concernant des «souches brutes» extraites par des bouturages divers (fragments d'hyménophore,, de chair ou de racine) : 58 isolements pour Montrichard et 29 pour Tournus, alors qu'il n'a pu en être effectué que 19 pour Malaucène, 14 pour Roaix et deux seulement pour Beaugency; les quatre autres stations (Manche, Finistère, Chateaurenard et Massif de la Sainte Baume) n'ont pu être représentées que par des semis multispores. On peut donc estimer que, sur la base d'échantillons extraits par des bouturages divers, les taux de fertilité des diverses populations apparaissent très élevés; les «souches brutes» qui ne fructifient pas normalement sont assez rares, leur mise en évidence nécessitant un échantillonnage suffisamment important. Enfin, pour les deux stations dont l'échantillonnage a répondu à cet impératif, les taux de fertilité sont apparus équivalents : 54/58 = 27/29 = 0,931.

Par contre, chez les «souches brutes» issues de semis multispores (Tab. II), les taux de fertilité sont toujours beaucoup plus faibles. Si l'on met à part les représentants des stations de Beaugency et du Massif de la Sainte-Baume qui

	Données pondérées			Données ramenées en taux		Données originelles
	Présence de blocages	Fructification normale	Total	Présence de blocages	Fructification normale	Nombre de "souches brutes"
Manche	15,613	7,783	23,396	0,667	0,333	(33)
Montrichard	5,053	3,895	8,948	0,565	0,435	(26)
Tournus	3,324	8,730	12,054	0,276	0,724	(25)
Roaix	1,833	5,083	6,916	0,265	0,735	(11)
Finistère	2,463	9,600	12,063	0,204	0,796	(25)
Malaucène	2,833	12,603	15,436	0,184	0,816	(29)

Tab. II. – Comportement fructifère en fonction de l'origine géographique de «souches brutes» issues de semis multispores.

constituent des échantillonnages à effectifs trop faibles (respectivement deux cultures fertiles sur quatre et aucune sur deux), on constate que les proportions des souches qui parviennent à la complète maturité sont relativement faibles chez certaines populations (Manche et Montrichard), nettement plus élevées, presque le double, chez les autres, mais encore nettement inférieures à celles que l'on obtient avec des échantillonnages par bouturages. Seuls les représentants de la station de Châteaurenard ont extériorisé un taux de fertilité de 1,000 mais l'échantillonnage est encore un peu faible (9 cultures) et il est vraisemblable que la non-manifestation de blocages n'y soit que la conséquence d'une insuffisance d'effectifs.

VARIABILITÉ DE L'ASPECT MORPHOLOGIQUE DES BASIDIOCARPES

Parmi les souches qui achèvent le cycle complet, il existe une assez grande variabilité de la morphologie des basidiocarpes. Indépendamment de divers faciès qui apparaissent sporadiquement et irrégulièrement, souvent d'ailleurs sous l'influence de facteurs externes, et de faciès occasionnels que nous regrouperons sous la rubrique «divers» (Pl. II, fig. 6 et Pl. IV, fig. 5 et 6), il est possible de distinguer cinq principaux types morphologiques de basidiocarpes :

Type I (Pl. I, fig. 1 et 2)

- Stipe régulier, cylindrique, le plus souvent inséré au centre du piléus, sauf dans le cas de carpophores en touffe dense, où les piléus de la périphérie sont excentrés.

- Piléus régulier, circulaire, d'abord bombé, puis déprimé, finalement à bord plus ou moins fortement retroussé; de couleur claire, ocracé pâle, à vergetures radiales plus foncées.

- Lames crème pâle, presque blanches, légèrement décurrentes sans former de filets sur le stipe, très rarement anastomosées.

Type II (Pl. II, fig. 1, 3 et 5)

- Stipe régulier, cylindrique à rétréci au sommet, généralement inséré au centre du piléus.

- Piléus régulier, circulaire, d'abord plan légèrement déprimé au centre, puis convexe plan creusé au centre, à marge arrondie (descendante) légèrement cannelée, infundibuliforme très évasée; de couleur claire, ocre pâle roussâtre, marge à festons plus clairs, plus ou moins évidents.

- Lames crème pâle, moyennement décurrentes, mais sans former de filets sur le stipe, anastomoses très rares.

Type III (Pl. I, fig. 3 et 4)

- Stipe fusiforme, rarement long, insertion au piléus généralement excentrique, même chez les exemplaires isolés.

- Piléus d'abord convexe omboné, puis légèrement déprimé, mais toujours omboné au centre, marge rarement retroussée à la fin; le plus souvent irrégulier, entier ou elliptique ou découpé en deux à trois larges lobes; surface parfois localement hérissée de granulations ou de verrues charnues, de couleur foncée, ocracé-brun; marge ornée de festons plus clairs.

- Lames plus foncées que dans les autres types, franchement crème légèrement ocracé; décurrentes et formant souvent des filets plus ou moins anastomosés sur le stipe.

Type IV (Pl. I, fig. 5 et 6)

- Stipe court, tronconique, inséré au centre du piléus.

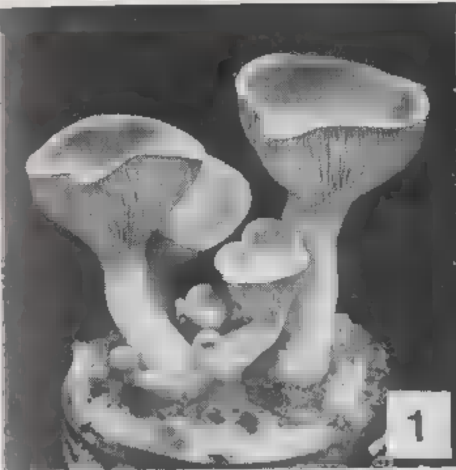
- Piléus étroit, d'abord convexe puis plan omboné, finalement légèrement déprimé omboné; de couleur très claire, crème pâle, presque blanc.

- Lames presque blanches, décurrentes, souvent anastomosées en réseau à la base.

Type V (Pl. II, fig. 2 et 4)

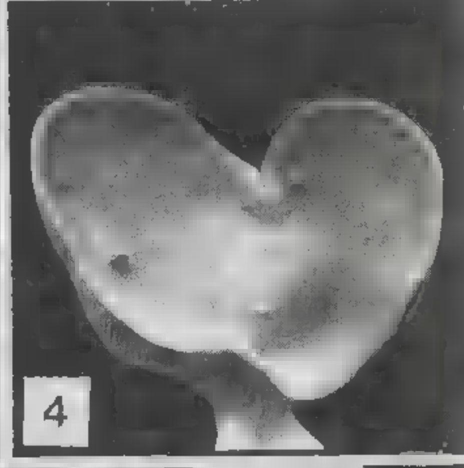
- Anomalies à caractère tératologique fréquentes.

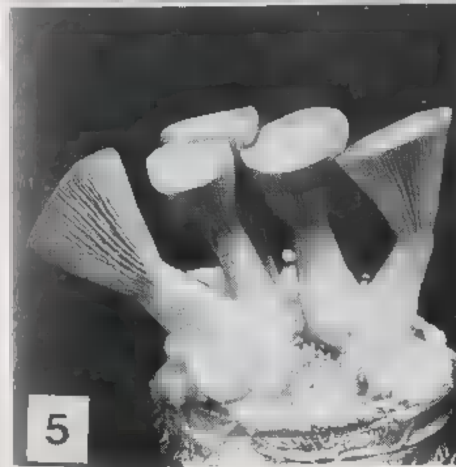
Pl. I - *P. eryngii.* – Type I, (or. env. de Millau). 1: basidiocarpes à pleine maturité; 2: basidiocarpes proches de la décrépitude. - Type III, (or. env. de Roaix). 3: basidiocarpes à pleine maturité; 4: détail de la surface d'un piléus. - Type IV, (or. env. de Malaucène). 5: basidiocarpes à pleine maturité; 6: détail de l'hyménophore.

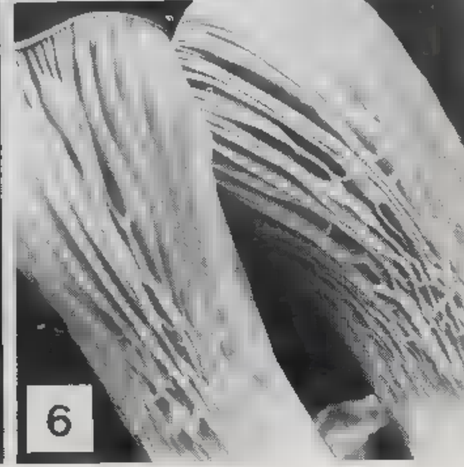












Source : MNHN, Paris

- Stipe court, souvent irrégulier, aplati, cannelé, fascié, éclaté, ramifié; insertion au piléus centrale ou légèrement excentrique.

- Piléus d'abord plan à marge descendante, puis déprimé à marge plus ou moins fortement retroussée; forme souvent irrégulière, parfois divisé en larges lobes; ocre-roussâtre à vergetures radiales plus foncées et très nettes, marge ornée de festons plus clairs; présence fréquente d'hyménophore surnuméraire.

- Lames presque blanches, décurrentes, souvent en long filet sur le stipe; anastomoses rares.

Lorsque les «souches brutes» sont normalement fertiles, il ne semble pas y avoir une influence notable des modalités d'isolement sur la variabilité morphologique. Les résultats de l'étude de 65 de ces souches, provenant de trois populations différentes (Montrichard, Malaucène et Roaix) sont présentés dans le Tableau III (en données pondérées pour les répétitions) : on peut y constater que la fréquence d'apparition effective de chaque type morphologique pour chacune des modalités d'isolement (chiffres droits) correspond sensiblement

Modalités d'isolement	Types morphologiques					Total
	Type II	Type III	Type IV	Type V	Divers	
Multispore	6,50 (6,06)	3,50 (3,17)	2,58 (1,81)	2,00 (2,72)	1,75 (1,27)	16,33 (15,03)
Chair	6,00 (6,06)	2,00 (3,17)			1,00 (0,90)	9,00 (10,13
Racine	9,73 (8,78)				0,00 (0,90)	9,73 (9,68)
Hyménophore	7,50 (7,78)	4,00 (3,17)	0,00 (1,81)	4,00 (2,72)	1,00 (1,27)	16,50 (16,75)
Total	29,73 (28,68)	9,50 (9,51)	2,58 (3,62)	6,00 (5,44)	3,75 (4,34)	51,56 (51,59)

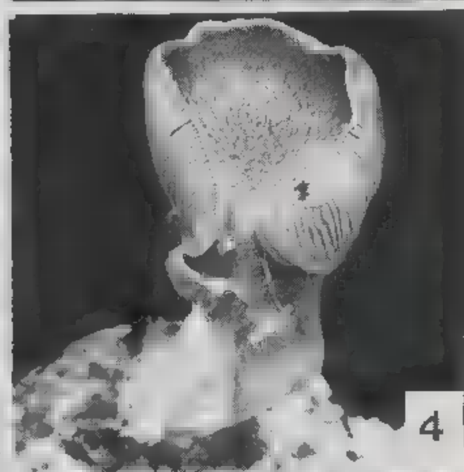
Tab. III. — Répartition des types de fructification en fonction des modalités d'isolement.

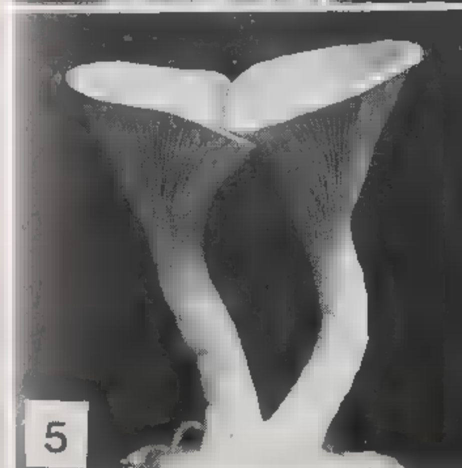
Pl. II. - *P. eryngii*. — Type II, (or. env. de Montrichard). 1, 3, 5: basidiocarpes à pleine maturité. - Type V, (or. env. de Malaucène). 2: basidiocarpes proches de la pleine maturité; 4: basidiocarpe avec hyménophore surnuméraire. - Faciès «divers», (or. env. de Châteaurenard). 6: basidiocarpe à chair molle et lames souvent anastomosées dans la vallécule.













Source : MNHN, Paris

à celle que l'on peut déduire (chiffres entre parenthèses) de l'hypothèse nulle supposant, au sein de chaque population et compte tenu de sa propre fréquence d'apparition des types qui y sont représentés, une indépendance totale de la variabilité morphologique par rapport aux modalités d'isolement.

En définitive, les modalités d'échantillonnage influent seulement sur le taux d'apparition des blocages, les semis multispores l'accroissant considérablement par rapport aux divers types de bouturages; par contre, elles ne modifient guère l'expression de la variabilité morphologique. Compte-tenu de cette uniformité de réponse des échantillons, quelles que soient les modalités de leurs isolements, il apparaît que certaines populations extériorisent des comportements homogènes, comme celle de Roaix dont les basidiocarpes, en culture, sont pratiquement toujours de type III, ou même celle de Montrichard dont la plupart des basidiocarpes (0,924) sont de type II, quelques-uns seulement de type

Séries	Racine	Stipe	Piléus	Hyméno-phore	Spores I	Spores II	Spores III	Spores IV
1	■	✱	■	■	■	■	✱	✱
2	■	✱	■	✱	■	☼	0	■
3	■		■	■	✱	■	✱	✱
4	✱	■	✱	■	■	■	✱	■
5		■	■	✱				■
6		■	✱	✱	✱			
7		■	☼	■	☼			
8		■		■	■			
9		✱		✱	■			
10				■	✱			
11					☼			
12					■			
13					■			

Tab. IV. - 0 : blocage végétatif. ☼ : blocage au niveau de la caryogamie. ■ : blocage en cours de méiose. ✱ : fructification normale.

«Divers». D'autres populations, au contraire, manifestent une plus grande variabilité, comme celle de Malaucène qui, géographiquement proche de la station de Roaix, ne produit pas le type III, mais un mélange des types II (0,345), IV (0,179), V (0,366) et quelques formes diverses.

Ces conclusions ont pu être confortées par une étude portant sur la population de Tournus où nous avons analysé les comportements de diverses «souches brutes» issues de treize basidiocarpes ou ensembles «racine infectée + basidiocarpe développé sur cette racine», à l'aide de séries d'échantillonnages aussi complètes que le permettait l'état du matériel d'origine : boutures de tissu de la racine infectée, de chair du stipe et du piléus, de fragments d'hyménophore, ainsi que semis multispores réalisés à partir de quatre dépôts successifs : I: spores déposées au cours des 14 premières heures de sporulation en laboratoire; II: spores déposées de la 15e à la 19e heure; III: spores déposées de la 20e à la 23e heure; IV: spores déposées de la 24e à la 40e heure (Tableau IV). Ces essais ont bien confirmé l'accroissement du taux d'apparition de blocages chez les semis multispores (4/25 = 0,160 contre 2/29 = 0,069 chez les bouturages), mais ils font également ressortir une homogénéité de comportement chez les «souches brutes» issues d'une même entité, «basidiocarpe» ou «ensemble racine + basidiocarpe» (Pl. III, fig. 1 à 5) : la série n° 7 montre le blocage en cours de méiose chez la plupart des souches, qu'elles soient obtenues par bouturages ou semis multispores (Pl. IV, fig. 1 à 4); la série n° 2 a montré systématiquement, et quel que soit le mode d'échantillonnage, un retard à la fructification associé à une baisse de la fertilité.

LE DÉVELOPPEMENT BASIDIOCARPIQUE ET SES PRINCIPAUX BLOCAGES EN CULTURE

Le développement des basidiocarpes du *P. eryngii* se réalise selon des processus relevant de la carpogenèse «diffuse» telle qu'elle a été définie par REIJNDERS (1963) : schématiquement, les hyphes s'agrègent plus ou moins parallèlement en un stipe cylindrique, puis divergent pour constituer le piléus à croissance marginale. Toutefois, comme nous l'avons vu, si les processus de la fructification se déroulent complètement chez la plupart des «souches brutes», qui produisent alors des basidiocarpes lamellés et fertiles, certaines de ces souches n'achèvent pas leur cycle complet.

En culture de laboratoire, après envahissement complet du milieu par le mycélium dicaryotique végétatif, ouverture des bocaux et mise en place du gobetage de vermiculite (cf. CAILLEUX et DIOP, 1976), le premier indice macroscopique de l'induction aux processus fructifères est la formation superficielle de petits flocons assez nombreux et mal définis : c'est le stade de la «nouaison». Certaines «souches brutes» restent totalement stériles, n'extériorisant, même dans les conditions habituellement favorables à la poursuite normale de la fructification, aucun processus de différenciation basidiocarpique ou, au maximum, évoluent seulement jusqu'à un faciès rappelant la «nouaison»

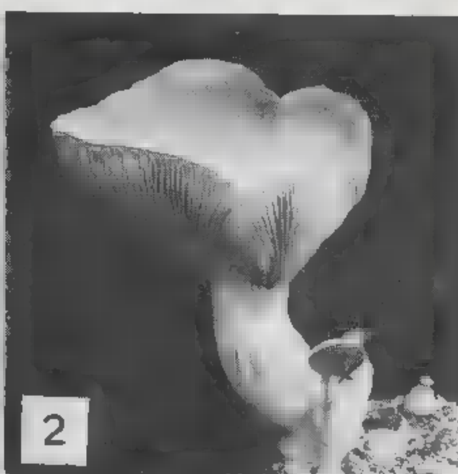
(Pl. V, fig. 1); puis, tout développement cesse. Ces blocages du cycle peuvent résulter de causes diverses, que nous n'avons pas cherché à préciser ici; nous les avons simplement regroupés sous l'expression de «blocages végétatifs».

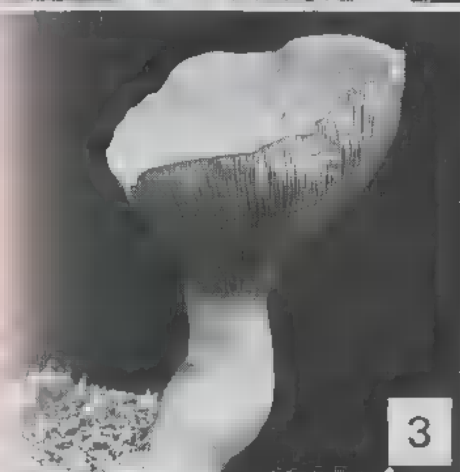
Peu après le stade de la «nouaison», les primordiums apparaissent à la surface de la culture, compacts, nombreux, isolés ou en groupes; d'abord globuleux, ils s'allongent et s'étoffent. Chez les cultures effectuées à 14-18°C avec des éclairements de 12 h par jour, quatre jours avant la formation des premières basidiospores (stade J-4), l'ébauche du piléus devient nettement visible mais encore sans traces de lames, ou celles-ci commençant à peine à s'ébaucher (Pl. V, fig. 2). Le jeune primordium contient alors uniquement des filaments bouclés et binucléés. Chez diverses «souches brutes», l'induction à la fructification peut se réaliser de manière apparemment normale, avec formation de primordiums comparables à ceux des souches pleinement fertiles, et cela jusqu'au stade J-4 où leur développement cesse brutalement et définitivement. Chez certaines, au moins, de ces souches, la structure reste banale jusqu'à ce stade J-4, avec des hyphes bouclées et binucléées. Le lendemain (stade J-3), le primordium a poursuivi sa croissance, étant toujours constitué de filaments bouclés et binucléés, mais les apex de certains d'entre eux se renflent, et on peut alors y observer les premières fusions nucléaires. A ce stade apparaissent çà et là de rares cystides. Chez les primordiums des souches bloquées au stade morphologique J-4, les articles des hyphes ont pris des longueurs variables, restant binucléés et alors fins, ou devenant plurinucléés et larges. Dans les deux cas, ils émettent souvent des diverticules latéraux à structure anormale et on n'observe aucun renflement pré-caryogamique des apex. N'ayant encore observé aucune figure de caryogamie dans les primordiums affectés par cet arrêt total de la croissance, nous désignons ce dernier par le terme de «blocage au niveau de la caryogamie», sans que cela n'implique a priori de relation de cause à effet.

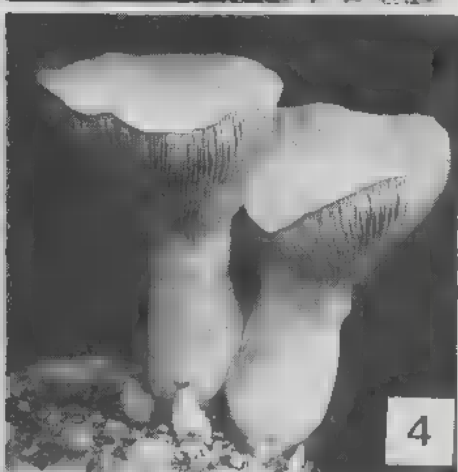
Au stade J-2, le piléus est encore enroulé, mais avec des lames déjà bien développées, sur lesquelles on retrouve un mélange des mêmes éléments que précédemment, associés à des figures de méiose I allant jusqu'au pachytène; les cystides, pour leur part, sont déjà abondantes. A ce stade morphologique, certaines souches extériorisent un arrêt prématuré des processus de développement du seul piléus, alors que le stipe poursuit sa croissance (Pl. V, fig. 3 et 4). Ce sont les «blocages en cours de méiose», qui n'inhibent pas complètement la carpogenèse, mais vont conduire à des basidiocarpes anormaux, à piléus avorté et, pour la plupart, stériles, à l'extrémité d'un stipe parfois relativement long.

Pl. III. - *P. eryngii*. - 1 à 5 : souches originaires des environs de Tournus, faciès homogène de la série n° 4, souches issues de : 1) bouturage de racine infectée, 2) bouturage de la chair du chapeau, 3) bouturage de l'hyménophore, 4) semis multispore I, 5) semis multispore III. 6: basidiocarpe sauvage «in situ» (or. env. de Montrichard).













Source : MNHN, Paris

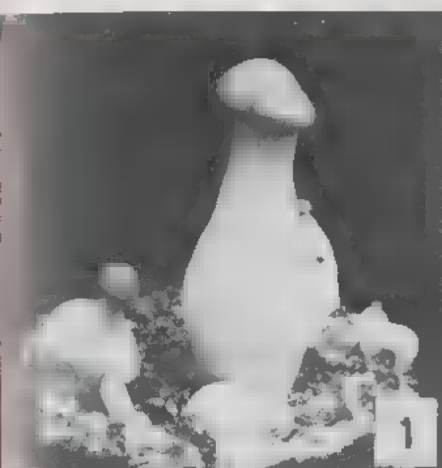
Au stade J-1, le piléus a déjà commencé à se dérouler; les figures de méiose les plus avancées correspondent aux débuts de la deuxième division de méiose, mais elles restent environnées de toutes les figures précédentes, y compris les simples renflements de l'apex binucléés. Enfin, à J, le piléus est quasiment adulte, bien que n'ayant pas encore atteint sa taille maximale, avec des figures allant jusqu'aux fins de méiose II et à la formation des premières basidiospores, encore assez rares: l'ensemble est toujours associé à toutes les figures précédentes. Passé ce stade, le basidiocarpe va poursuivre encore sa croissance pendant plusieurs jours, jusqu'à ce qu'il ait atteint ses dimensions maximales, et cela avec des apparitions quotidiennes de nouvelles figures de méiose.

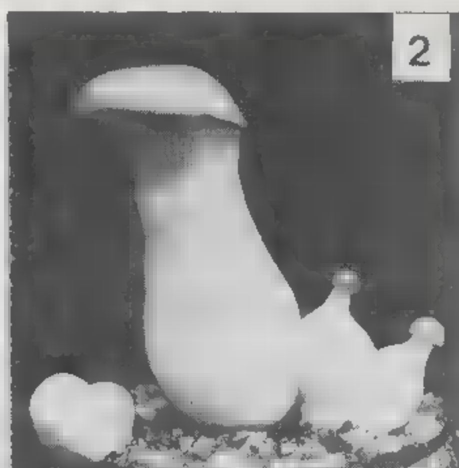
Sans nous attarder plus longtemps sur la description des évènements méiotiques, que nous développerons par ailleurs et que nous n'évoquons ici qu'à titre de repères chronologiques permettant de situer les manifestations des principaux blocages des processus de la fructification, il est aisé de constater que, chez le *P. eryngii*, les évènements méiotiques sont «diffus», comme le sont les autres processus ontogéniques du basidiocarpe, et non plus ou moins synchrones et regroupés à des stades précis du développement comme on l'observe chez des champignons à carpogenèse «concentrée» tels que les Coprins (PRÉVOST, 1962; LU, 1967; MANACHERE, 1978; etc.).

Origine des souches	Blocage vegetatif	Blocage au niveau de la caryogamie	Blocage en cours de méiose	Fructification normale	Total
Manche	0,283	0,160	0,224	0,333	1,000
Montrichard	0,022	0,321	0,222	0,435	1,000
Tournus	0,031	0,081	0,164	0,724	1,000
Roaix	0	0	0,265	0,735	1,000
Finistère	0	0,052	0,152	0,796	1,000
Malaucène	0	0,065	0,119	0,816	1,000

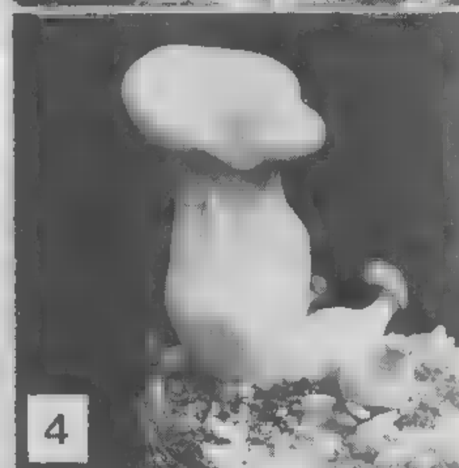
Tab. V. – Taux d'apparition des divers blocages en fonction de l'origine de «souches brutes» issues de semis multispores (données pondérées ramenées en taux).

Pl. IV. - *P. eryngii*. – 1 à 4: souches originaires des environs de Tournus, série n° 7, manifestations de blocage en cours de méiose, souches issues de : 1) bouturage de l'hyménophore, 2) bouturage de la chair du chapeau, 3) bouturage de la chair du pied, 4) semis multispore. 5 et 6 : Faciès «divers», souches issues de deux semis multispores effectués à partir de la même sporée (or. Finistère).

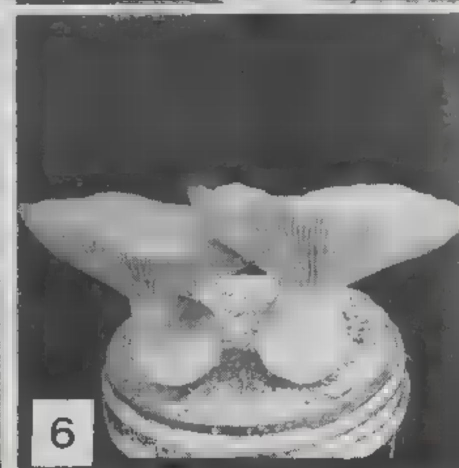




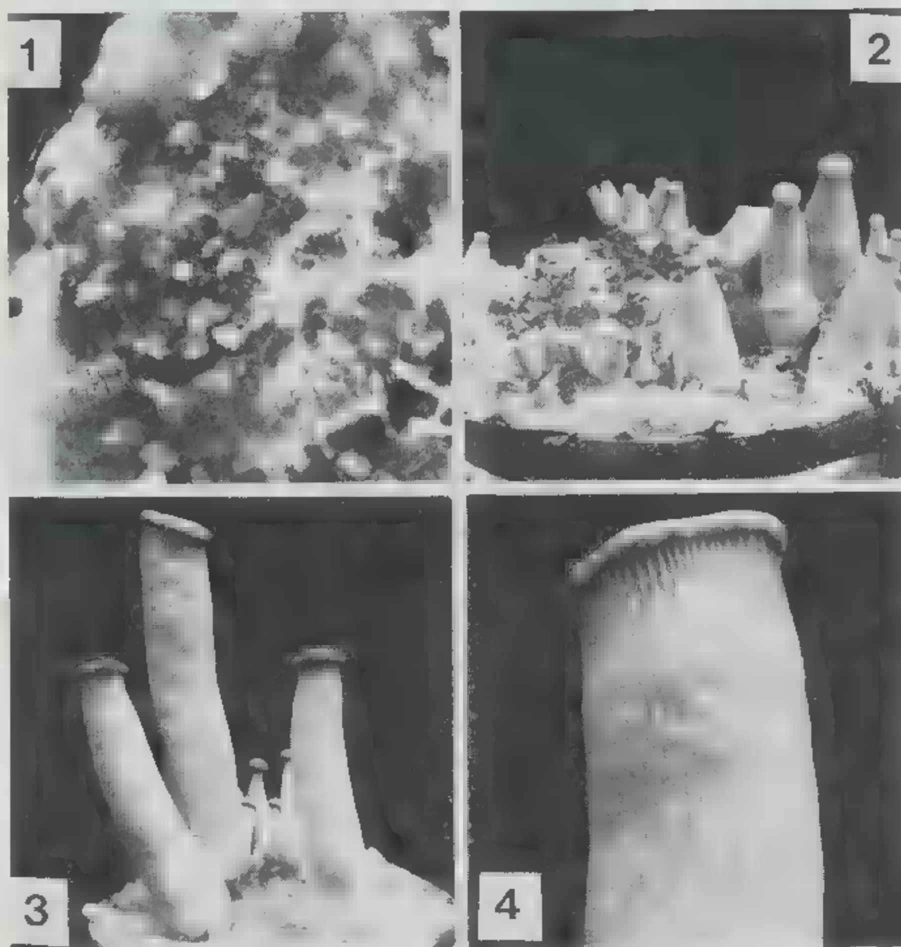








Source : MNHN, Paris



Pl. V. - *P. eryngii.* – Stades morphologiques de manifestation des blocages. 1 : à la «nouaison». 2 : au niveau de la caryogamie. 3 : en cours de méiose. 4 : détail de 3.

Examinons maintenant la variabilité de l'apparition des divers types de blocages au sein de nos quelques populations. Dans le cas des «souches brutes» issues de bouturages divers, nous avons vu que six seulement étaient affectées de blocages. Quatre sont originaires de Montrichard, deux d'entre elles manifestent le blocage au niveau de la caryogamie, les deux autres le blocage en cours de méiose, ce qui représente pour ces deux blocages des taux de 0,035 parmi les représentants de cette station. Les deux dernières souches non fructifères sont encore affectées du blocage en cours de méiose et proviennent de Tournus,

station qui extériorise alors un taux d'apparition de ce blocage un peu plus élevé (0,069) mais dont la différence, par rapport à Montrichard ne peut être tenue pour significative compte-tenu des dimensions des échantillonnages.

Chez les souches issues de semis multispores pour lesquels nous avons disposé d'un échantillonnage suffisant (Tab. V), les taux d'apparition des divers blocages sont beaucoup plus variables. Un certain nombre d'entre eux, échelonnés de 0,022 à 0,083 ne peuvent pas être tenus pour effectivement différents de ceux observés dans le cas des échantillonnages par bouturages divers. Il en est de même pour les cas où aucun blocage ne s'est manifesté, les dimensions des échantillons ne permettant pas de conclure à une absence de possibilité d'expression des blocages concernés. En définitive, si le semis multispore réduit systématiquement le taux de fertilité, il ne le fait en accroissant les taux de blocage chez toutes les populations étudiées que dans le cas du blocage en cours de méiose. L'accroissement des taux du blocage au niveau de la caryogamie n'apparaît nettement que chez les représentants de deux populations (Manche et Montrichard) et celui des blocages végétatifs chez une seule (Manche). La variabilité de l'intervention du semis multispore au niveau de ces deux types de blocages pourrait d'ailleurs être la seule cause de l'abaissement des valeurs des taux de fertilité des souches originaires de ces deux stations par rapport aux taux extériorisés par les souches extraites des quatre autres (Tournus, Roaix, Malaucène et Finistère).

Enfin, si le semis multispore amplifie dans certains cas la manifestation des blocages, il ne les induit certainement pas. Nous avons vu que deux d'entre eux apparaissent à de faibles taux chez les souches obtenues par des bouturages divers lorsque l'échantillonnage est suffisamment important. Il est, de plus, intéressant de constater que quatre des six blocages que nous avons ainsi pu observer sont des blocages en cours de méiose, c'est-à-dire les plus universellement représentés chez les semis multispores et que les deux autres sont des blocages au niveau de la caryogamie chez deux «souches brutes» originaires de Montrichard, station qui a produit, et de beaucoup, le plus grand nombre de blocages de ce type en semis multispores.

DISCUSSION

Parmi les hypothèses simples capables de rendre compte du comportement des souches issues de semis multispores par rapport à celui des souches provenant de boutures, on peut penser à une intervention de recombinaisons méiotiques lors de la formation des basidiospores, utilisées pour constituer l'échantillonnage. Toutefois, les boutures d'hyménophore, contenant un mélange d'hyphes parentales et de basidiospores, se comportent pratiquement comme les boutures d'hyphes parentales seules (fragments de chair du basidiocarpe ou de racine infectée), et non comme les semis multispores. Si l'accroissement des taux d'apparition des blocages est le résultat de recombinaisons, cela implique alors une élimination quasi-systématique des noyaux recombinants

apportés par les basidiospores, chez les boutures d'hyménophores.

Une telle élimination pourrait résulter d'une inhibition de la germination des basidiospores par le mycélium dicaryotique parental actif, comme cela s'observe fréquemment chez divers champignons. Toutefois, lors du repiquage, les hyphes bouturées ne reprennent pas immédiatement leur croissance et, si des spores sont présentes sur les fragments mycéliens, l'expérience montre qu'elles peuvent germer durant cette période de latence. Ces inhibitions peuvent probablement jouer un rôle dans une telle élimination, mais elles ne permettent pas, à elles seules, de rendre compte du comportement des boutures d'hyménium.

Lorsque plusieurs basidiospores sont mises en présence, elles germent et les filaments auxquels elles donnent naissance établissent entre eux de nombreuses anastomoses. On se trouve devant un phénomène de Buller complexe dans lequel s'effectue une élimination de la plupart des noyaux avec sélection finale d'un seul couple. Selon PRÉVOST (1962), l'élément déterminant de la sélection des noyaux, dans le phénomène de Buller, pourrait être le degré d'hétérozygotie globale (sur l'ensemble des génomes ou, au moins, de systèmes polygéniques impliquant de nombreux gènes majeurs) : le couple sélectionné serait celui pour lequel les deux noyaux possèdent la plus grande hétérozygotie relative.

Dans la descendance post-méiotique d'un dicaryon, les couples de recombinants possibles ne peuvent être hétérozygotes que pour les facteurs qui sont déjà dans cet état chez le couple de noyaux parentaux : leurs degrés d'hétérozygotie réciproques, ou ceux de chacun d'entre eux par rapport à l'un ou l'autre des types parentaux (le dicaryon parental existant en nombre relativement important chez la bouture d'hyménophore) ne pourront être qu'inférieurs ou, au mieux, égaux à celui du couple parental. On peut calculer le nombre théorique de couple de noyaux qui, chez N spores issues d'un dicaryon hétérozygote pour F facteurs à ségrégation indépendante, posséderont un taux d'hétérozygotie égal à celui du dicaryon parental; la probabilité d'obtention de tels couples est de :

$$\frac{2^F}{2} \cdot \left[\frac{N}{2^F}\right]^2 \cdot \frac{2\,(N-2)!}{N!} = \frac{N}{2^F.(N-1)}$$

L'introduction supplémentaire de tout facteur non indépendant, lié à l'un quelconque des F facteurs précédents avec un taux de recombinaison k, modifiant cette probabilité de $[k^2 + (1-k)^2]$, un système de P = F + L facteurs réunis en F groupes de liaisons produira des couples de noyaux possédant le même degré d'hétérozygotie que le couple parental avec une probabilité de :

$$\frac{N}{2^F.(N-1)}\,[k_1^2 + (1-k_1)^2]\,[k_2^2 + (1-k_2)^2]\,\ldots\ldots\,[k_L^2 + (1-k_L)^2]$$

k_1, k_2, k_L, étant les taux de recombinaison respectifs de chacun des L facteurs par rapport à celui des F facteurs indépendants auquel il est lié.

On peut imaginer, à titre d'exemple, un système de 14 facteurs répartis deux à deux en sept groupes de liaisons (le nombre chromosomique du *P. eryngii* étant de l'ordre 11) avec des taux de recombinaison respectifs de 0,08, 0,12, 0,21, 0,25, 0,31, 0,35 et 0,40. La probabilité d'obtention de couples d'homocaryons à degré d'hétérozygotie égal à celui du cycle parental est alors de 3,5 pour 10000 spores; on voit facilement qu'elle devient très faible dès que les facteurs impliqués dans le phénomène deviennent nombreux, ce qui est précisément le cas du mécanisme proposé par PRÉVOST. En réalité, par rapport à ce modèle bâti sur des confrontations bisporiques, les fusions multiples suivies des sélections de noyaux qu'on observe chez le semis multispore tendent à augmenter la fréquence de constitution de tels couples. Au contraire, chez le bouturage de fragment d'hyménophore, les basidiospores ne sont pas seules mais disséminées au sein d'une masse relativement importante d'hyphes du dicaryon parental. Les chances de fusion d'un homocaryon recombinant avec un partenaire suffisamment hétérozygote par rapport à lui pour que la conservation de son noyau soit assurée deviennent faibles au regard de celles d'une fusion avec le type parental. Ce dernier éliminera alors le noyau recombinant dont le degré d'hétérozygotie par rapport aux deux noyaux parentaux est moindre que celui existant entre eux. Si l'on ajoute l'avantage sélectif que constitue le nombre des cellules parentales par rapport à celui de chaque couple éventuellement compétitif qui aurait pu se former, on conçoit que le bouturage d'hyménophore puisse tendre à conserver le type parental. Compte-tenu des dimensions de nos échantillonnages, il extériorise un comportement pratique

+ Formation de boucles après confrontation

− Pas de boucles après confrontation

■ Fructification normale

✿ Blocage au niveau de la caryogamie

0 Blocage végétatif

	611 (A_2B_2)	620 (A_2B_2)	619 (A_2B_2)	621 (A_1B_1)	623 (A_1B_1)	618 (A_1B_1)
618 (A_1B_1)	+	+	+	−	−	
623 (A_1B_1)	+	+	+	−		
621 (A_1B_1)	+	+	+			
619 (A_2B_2)	−	−		■	0	✿
620 (A_2B_2)	−			■	0	✿
611 (A_2B_2)				0	■	✿

Tab. VI. – Comportement fructifère des neuf «souches contrôlées» issues des confrontations de six homocaryons appartenant à deux groupes de compatibilité complémentaire.

ment identique à celui des boutures de chair ou de racines infectées qui, le plus souvent, ne reproduisent que ce type parental.

Le mécanisme de sélection des noyaux proposé par PRÉVOST permettant d'expliquer l'élimination presque systématique des noyaux recombinants chez les boutures d'hyménophore, on ne peut pas rejeter l'hypothèse d'une intervention des recombinaisons méiotiques dans le comportement singulier des semis multispores. Mais, dans ce cas, les modalités de cette intervention ne sont certainement pas simples. A priori, les fréquences d'apparition des blocages lorsque le semis multispore semble intervenir (0,283 pour le blocage végétatif, 0,160 et 0,321 pour celui au niveau de la caryogamie, six valeurs échelonnées entre 0,119 et 0,265 pour celui en cours de méiose) ne sont pas trop éloignées, dans un échantillonnage comme celui-ci, du taux théorique de manifestation de phénotypes monogéniques récessifs dans la descendance d'un couple de noyaux parentaux hétérozygotes pour ce caractère. L'étude de «souches contrôlées», qui est en cours, ne permet pas de retenir actuellement cette hypothèse : à titre d'exemple, le tableau VI présente les comportements de neuf «souches contrôlées» issues de la population de Millau : aucun des deux blocages extériorisés ici n'apparaît avec une répartition compatible avec le schéma d'une simple nécessité monogénique.

BIBLIOGRAPHIE

CAILLEUX R. et DIOP A., 1976 – Recherches préliminaires sur la fructification en culture du *Pleurotus eryngii* (Fr. ex DC.) Quél. *Rev. de Mycol.* 40 : 365-388.

CAILLEUX R. et DIOP A., 1978 – La fructification du *Pleurotus eryngii* en conditions de culture non stériles et ses incidences pratiques. *Rev. de Mycol.* 42 : 1-11.

LU B.C., 1967 – Meiosis in *Coprinus lagopus* : a comparative study with light and electron microscopy. *J. Cell. Sci.* 2 : 529-536.

MANACHERE G., 1978 – Morphogenèse des carpophores de Basidiomycètes supérieurs. Connaissances actuelles. *Rev. de Mycol.* 42 : 191-252.

PRÉVOST G., 1962 – Étude génétique d'un Basidiomycète : *Coprinus radiatus* Fr. ex Bolt. *Ann. Sc. Nat., Bot. et Biol. Vég.*, 12e Sér., 3 : 425-613.

REIJNDERS A.F.M., 1963 – *Les problèmes de développement des carpophores des Agaricales et de quelques groupes voisins.* Den Haag, Junk, 412 p.

TURMEL J.M., 1948 – Répartition géographique des *Eryngium*. I. Ancien Monde. *Bull. du Muséum Nat. Hist. Nat.*, 2e sér., 20 : 395-401.

Nous remercions ici nos collègues R. ASTIC, A. DENIS, J.C. DONADINI, G. FORTOUL, R. FRANQUET, G. GARNIER, C. et M. MOREAU, J. NICOT, L. RIOUSSET et L. SIGNORET qui nous ont aimablement communiqué des sporées ou des échantillons vivants de Pleurotes.

NOTES ON THE MORPHOLOGY OF SOME ISOLATES OF PHYTOPHTHORA FROM AUSTRALIA

by L. GERRETTSON-CORNELL*

ABSTRACT. The diagnostic importance of most morphological characteristics of 26 isolates of *Phytophthora* from various parts of Australia on two agar media has been discussed in this paper. Of these 13 were *P. cinnamomi* Rands, 9 were *P. cryptogea* Pethyb. & Laff., and 4 were *P. cambivora* (Petri) Buism. *P. cambivora* appears to have been found only 5 times in this country.

A new technique for the production of sporangia was tested and has proved highly reliable. This study also showed the difficulty of identifying *P. cambivora* from its morphology in the absence of oogonia under the experimental conditions. For certain characteristics, *P. cambivora* appeared to be closer to *P. cryptogea* than to *P. cinnamomi*.

RÉSUMÉ. La valeur systématique des caractères morphologiques de 26 souches australiennes de *Phytophthora*, cultivées sur deux types de milieux de culture est discutée. 13 souches appartiennent à *P. cinnamomi* Rands, 9 à *P. cryptogea* Pethyb. et Laff., et 4 à *P. cambivora* (Petri) Buism. Une technique nouvelle, favorable à la production des sporanges est proposée. Malgré la difficulté d'identifier *P. cambivora* en l'absence d'oogones, l'espèce apparaît plus proche de *P. cryptogea* que de *P. cinnamomi*.

INTRODUCTION

The present work describes most of the obvious morphological features of a number of isolates of *Phytophthora cinnamomi* Rands, *P. cryptogea* Pethyb. and Laff., and *P. cambivora* (Petri) Buism. from various parts of Australia. The study is part of a more comprehensive research programme designed to review the diagnostic importance of each character for *Phytophthora* species in view of the existing variability and differences often established with other descriptions.

* Forestry Commission of New South Wales, Beecroft, N.S.W., 2119, Australie.

The genus *Phytophthora* is widespread in Australia (GERRETTSON-CORNELL, 1976). In New South Wales *P. cinnamomi* and *P. cryptogea* have been frequently isolated from forest soils. *P. cambivora* has been detected only 4-5 times in this continent and this accounts for the low number of isolates available for this study. A thorough study of the sexuality has not been carried out but whenever possible the compatibility type of each isolate has been determined.

MATERIALS AND METHODS

a) Origins of cultures

The origins of the cultures of *Phytophthora* used in this study are listed in Table 1. Their identity was assessed or confirmed by the author, prior to the beginning of this work, by using the keys of WATERHOUSE (1954, 1963), FREZZI (1950) and various other descriptions (TUCKER, 1931; GRENTE, 1961; CHITZANIDIS and KOUYEAS, 1970). Two of the cultures were originally identified by the donors as *P. drechsleri* Tucker but on the basis of their morphology could not be separated from *P. cryptogea*. This is in agreement with other reported findings (BUMBIERIS, 1974; SHEPHERD, 1978 a). They also failed to grow at 34-36° C, in contrast to the description for *P. drechsleri* by WATERHOUSE (1963) and hence have been considered to be synonymous with *P. cryptogea*.

b) Mycelial growth and sporangial formation

Two media were used :

1. Corn meal agar (CMA) (Oxoid, 17 g/L). This medium is particularly suitable for the production of coralloid hyphae in some *Phytophthora* species. For example, during this study it was noticed that the mycelial structure of *P. cinnamomi* can vary considerably between isolates and also with the type of substrate used but tends in most cases to produce a coralloid type of growth on CMA. Moreover, because the aerial mycelium of most *Phytophthora* species on this medium is usually lacking or very poor, this enables a clear vision of the colony by direct microscopical examination of the cultures in the plates.

2. 2% V-8 juice agar (Uncentrifuged, pH 4.5). This medium, like CMA, enables a direct examination of cultures under the microscope and is also very good for the production of chlamydospores, sporangia and oogonia. Moreover, none of the present keys for the genus *Phytophthora* has been based on this medium.

For each isolate on each medium, three plates were used. They were inoculated centrally with a disc of agar mycelium set upside-down and incubated in darkness at 25° ± 1°C. They were examined every two days during which time they were exposed to room light.

To induce the formation of sporangia, 3 plates for each *Phytophthora* isolate

TABLE 1. List of isolates of Phytophthora used

Culture No.	Species	Mating type	Area of origin	Donor	Host association
8	*P. cinnamomi*	A1	Ourimbah, N.S.W.	Author	*E. saligna*
36	"	A2	Eden, N.S.W.	Author	*E. sieberi*
93	"	A2	Sunny Corner, N.S.W.	Author	*P. radiata*
102	"	A2	Madden's Plain, N.S.W.	Author	*E. gummifera*
51	"	A2	Wyong, N.S.W.	Author	*E. paniculata*
103	"	A2	West Pennant Hills, N.S.W.	Author	*E. pilularis*
DAR 19881	"	A2	Mt. Kuringai, N.S.W.	J. Walker	*Pimelea rosea*
DAR 25999	"	A2	Kenthurst, N.S.W.	J. Walker	*Actiridia chinensis*
T240	"	A2	Waterfall Bay, Tas.	F. Podger	*E. obliqua* and *Pultenea*
3477	"	A2	Kuranda, Qld.	B. Brown	Rainforest soil
3392	"	A1	Kuranda, Qld.	B. Brown	Rainforest soil
SC 50	"	A1	Manjimup, W.A.	J. Titze	Unknown
SC 90	"	A2	Kirrup, W.A.	J. Titze	*E. marginata*
S 111	*P. drechsleri*	A2	Unknown, N.S.W.	J. Shepherd	Unknown
S 121	*P. cryptogea*	A2	Adelaide, S.A.	J. Shepherd	Garden soil
31	"	A2	Gerringong, N.S.W.	Author	*P. radiata*
91	"	A2	Sunny Corner, N.S.W.	Author	*P. radiata*
104	"	–	West Pennant Hills, N.S.W.	Author	*E. pilularis*
105	"	A2	West Pennant Hills, N.S.W.	Author	*E. pilularis*
P7	"	A2	Adelaide, S.A.	M. Bumbieris	Garden soil
DAR 17095	*P. drechsleri*	–	Glen Innes, N.S.W.	J. Walker	*Carthamus tinctoris*
DAR 24233	*P. cryptogea*	–	Adelaide, S.A.	J. Walker	*Malus sylvestris*
S 104	*P. cambivora*	A1	Unknown	J. Shepherd	Unknown
S 107	"	A2	Perth, W.A.	J. Shepherd	*Malus sylvestris*
82	"	A1	Wallaroo, N.S.W.	Author	*E. paniculata*
WA 1390	"	A1	Perth, W.A.	R.F. Doepel	*Pyrus communis*

– : Did not form oogonia.

of 1 week old colonies on 2% V-8 agar flooded with glass distilled water. Young cotyledons of *Eucalyptus sieberi* L. Johnson, surface sterilized with 70% ethanol for 5 to 10 seconds and then rinsed in sterile distilled water, were used. They were floated on the water with which cultures had been flooded. These plates were then covered with their lids and incubated at room temperature (18-30°C), under a 40 W Grolux lamp. This new method for inducing sporangia formation is the author's adaption of the technique of MARKS and KASSABY (1974) for the isolation of *P. cinnamomi* from soil. It has proved extremely reliable provided the following conditions are observed :

- The test is made at temperatures above 16°C, and preferably between 20° and 25°C, either under a Grolux lamp or in a room with natural lighting plus 40 W, 3500° K fluorescent lamps. Exposure to light is either constant or for 8-10 hours a day.

- Not less than 10-15 cotyledons per plate of ca. 9 cm in diameter should be used.

- Young cotyledons, preferably between 2 and 3 weeks of age are used. At the third to fourth week and particularly at the appearance of the first pair of leaves, the formation of sporangia may be markedly reduced, or ceases altogether.

- It may happen, sometimes, that the water in the plates stagnates which may inhibit the formation of sporangia. It is advisable in that case to change the water a couple of times after 24-36 hours from the beginning of the experiment.

The formation of sporangia for all isolates of *Phytophthora* tested was preceded by colonization of the tissues of the host cotyledons by the mycelium and a concomitant, gradual change in colour of the underside purple colour of the leaves to green in 1 to 3 days.

c) Terminology

BLACKWELL's (1949) terminology has been used with some minor additions, as follows :

- Swollen hypha. It is an hypha or part of it, usually a long segment that is markedly enlarged. It may either be uniformly or irregularly enlarged (GERRETTSON-CORNELL, 1979). In this category, the large branches of swollen coralloid hyphae (fig. 1 and 2) are also included.

- Coralloid hypha. Coralloid hypha are generally branches of first and second order and are irregularly shaped. A mycelium is coralloid if it is formed prevalently coralloid hyphae, either with or without swollen hyphae. Coralloid hyphae may be single in which case they may be either alternate or opposite or be arranged in verticils on the bearing hypha.

Coralloids hyphae may bear one and even more swelling and/or chlamydospores.

- Swelling and chlamydospore. A swelling is a comparatively small portion

of an hypha which is markedly enlarged to form a globose, subglobose, or irregularly shaped body. It can be either sessile, terminal or intercalary, single or in clusters. *P. cinnamomi*, particularly on V-8 agar, produces botryose, thin-walled, greyish to yellow-brownish swellings, either globose, subglobose or irregularly shaped. It is often difficult to distinguish these from the chlamydospores. Chlamydospores have a septum or septa (if they are intercalary) which separates them from the bearing hypha but this is not always easy to see.

d) Period of observation

Results of this study were collected over a period of observation of 2 weeks.

RESULTS

Mycelium

On CMA all cultures of *Phytophthora* exhibited a type of mycelium growth eminently submerged into the agar with nil or very poor aerial mycelium. Colonies of *P. cinnamomi* on this medium were entirely or almost entirely coralloid. Colonies of *P. cambivora* were similar to *P. cinnamomi* although they formed more swollen hyphae which were clustered at the edge of the colonies or within 2-3 cm round the inoculum. Large branches of markedly swollen coralloid hyphae were observed in all isolates of *P. cambivora* (fig. 1, 2). In the past, the author has also observed a few of these formations in some isolates of *P. cinnamomi* from Eden, N.S.W. The mycelium of *P. cryptogea* was composed entirely or almost entirely of tubular hyphae. However, isolates S121 and 104 showed the presence of many coralloid hyphae, particularly round the inoculum.

Terminal and/or sessile swellings were numerous in *P. cinnamomi* but they also occured to a lesser extent in *P. cambivora* and there were a few in two isolates of *P. cryptogea*. A few, small clusters of intercalary swellings of the net-like type of configuration (WATERHOUSE, 1963) were seen in four cultures of *P. cryptogea*. Very few chlamydospores were formed by all isolates of *P. cinnamomi* and none by *P. cryptogea* and *P. cambivora*. Neither sporangia nor organs of fusion were formed by these *Phytophthora* species on corn meal agar.

The results of the microscopical examination of 2-week-old cultures on V-8 agar (Table 2) showed that all isolates of *P. cinnamomi* formed abundant botryose swellings and chlamydospores (fig. 3, 4) whereas these were not observed in *P. cryptogea* and *P. cambivora*. Hence growth on V-8 constitutes an important test for the identification of *Phytophthora*.

Table 2 also includes the mean diameter and range of the chlamydospores of *P. cinnamomi* based on samples of 50 chlamydospores for each isolate. By analysis of variance some of these values were found to be significantly different at the 1% level which may indicate real difference among isolates

TABLE [illegible] Mycelium characteristics on 2% V8 agar

			S					
	CH	SH	T	I	Cl	Cld (µm)	Sp	Of
P. cinnamomi								
8	++	+	++	–	++	27(17-53)	–	–
36	++	+	++	+	++	31(18-51)	–	–
93	++	++	++	+	++	33(10-56)	–	–
102	++	+	++	–	++	37(22-59)	–	–
51	++	[illegible]	++	+	++	35(18-49)	–	–
103	++	+	++	–	+	31(15-48)	–	–
DAR 19881	++	+	++	–	++	44(22-55)	–	–
DAR 25999	++	++	++	+	+	33(15-48)	–	–
T240	++	+	++	–	++	34(15-55)	–	–
3477	++	+	++	+	++	41(16-66)	–	–
3392	++	+	[illegible]	+	++	41(22-59)	–	–
SC50	++	+	++	+	+	34(15-48)	–	–
SC90	++	–	++	–	–	35(22-48)	–	–
P. cryptogea								
S111	+	+	–	+	–	–	–	–
S121	+	+	–	+	–	–	–	–
31	+	+	–	+	–	–	–	–
91	+	+	–	+	–	–	–	–
104	+	+	–	–	–	–	–	–
105	+	+	–	–	–	–	–	–
P7	+	–	–	+	–	–	+	–
DAR 17095	+	+	–	+	–	–	–	–
DAR 24233	+	+	–	+	–	–	–	–
P. cambivora								
S104	++	+	+	+	–	–	–	–
S107	++	++	+	–	–	–	–	+
[illegible]	++	++	+	+	–	–	–	–
WA 1390	++	++	+	–	–	–	–	–

– : none observed
++ : abundant
CH : coralloid hyphae
T : terminal and/or sessile
Cl : chlamydospores
Cld: chlamydospores dimensions
Of : organs of fusion
+ : scarce
[illegible] : swollen hyphae [illegible] : swellings
I : intercalary
Sp : sporangia

regarding this particular characteristic. This fact shed further doubt on the value of the character «size» in identification of species. Sporangia and oogonia were not formed by most isolates of *Phytophthora* on V-8 agar over the period of observation. Only one isolate of *P. cryptogea* (P 7) formed 4 sporangia.

TABLE 3. Morphological characteristics on 2% V-8, under water and sporangia production by the cotyledon method

	Sporangia formation	Sporophore branching A	[illegible]	C	Intercalary swellings	Chlamydospores
P. cinnamomi						
[illegible]	++	++	++	++	+	++
36	++	++	++	++	+	++
93	++	++	-	+	- to +	++
102	++	++	+	+	+	++
51	++	++	+	+	+	++
103	++	++	-	+	+	++
DAR 19881	++	++	+	+	+	++
DAR 25999	++	++	+	+	-	+
T240	++	++	+	+	-	++
3477	++	++	-	-	+	++
3392	++	++	+ to ++	++	+	+
SC50	++	++	-	++	+	++
SC90	++	++	+ to ++	++	- to +	+
P. cryptogea						
S111	++	++	++	+	++	-
S121	++	++	++	+	++	+
31	++	++	+	-	++	-
91	++	++	++	++	++	-
104	++	++	+	+	++	-
105	++	++	+	-	++	-
P7	++	++	++	+	++	-
DAR 17095	++	++	++	+	+	-
DAR 24223	++	++	++	++	++	-
P. cambivora						
S104	++	++	+	-	++	-
S107	++	+ to ++	-	++	++	+
82	++	++	+	-	++	-
WA 1390	++	++	+	+	- to +	-

A: Sporophore unbranched B: sympodial branching

C: Proliferation through the empty sporangium.

-: none observed +: scarce ++: abundant

Sporangia

All isolates of *Phytophthora* in this study formed abundant sporangia on eucalypt cotyledons and surrounding agar. *P. cryptogea* produced them more rapidly and in the greatest quantity.

In *P. cryptogea* and *P. cambivora*, at the edge of cotyledons, large clusters of intercalary swellings of the net-type of configuration were also formed (fig. 5, 6, 7, 8). The diameter of these swellings reached 31µm. These formations in the two species looked exactly the same. A few (3) swellings in S 121 and S 107 exhibited dividing septa and have by definition to be regarded as chlamydospores. Isolate WA 1390 differed from the other isolates of this species in that it formed only one group of intercalary swellings on one plate. The similarity between *P. cryptogea* and *P. cambivora* with regard to this characteristic has already been reported (GERRETTSON-CORNELL, 1979). Under the conditions of the experiment, *P. cinnamomi* formed large clusters of botryose swellings and chlamydospores. On one occasion however a net-like type of configuration was observed inside one of these large groups. It was clearly observed to have originated by proliferation from each single swelling or chlamydospore rather than being an enlargement at more or less regular intervals of the same hypha.

Sympodial branching of the sporophore from below and proliferation through the empty sporangium were observed in most isolates of *Phytophthora*. Of the sympodial branching both close and the lax type occured, the close type being more frequently observed in *P. cryptogea*. The close type also occurred in *P. cinnamomi* and *P. cambivora*. In isolate 3477 (*P. cinnamomi* from Queensland) no branching of the sporophore was ever seen. As Table 3 clearly indicates, branching of the sporophore cannot be regarded as a distinctive character of identification.

Results of this work do not seem to be consistent with NEWHOOK's et al. (1978) new key of the genus *Phytophthora* on this particular aspect.

One hundred sporangia were selected for measurement from each isolate of *Phytophthora*. The dimensions of these sporangia are presented in Table 4.

There were no data for isolate S 107 since this fungus died and could not be replaced. However, it had previously been observed to be able to form sporangia with the cotyledon method and large clusters of intercalary swellings. Sporangia of all isolates of *Phytophthora* of this study were non-papillate ($< 2\mu m$) and had a wide pore ($> 7\mu m$).

The analysis of variance of the sporangial parameters showed the existence of highly significant ($p > 0.01$) difference between and within each species of *Phytophthora* for these characteristics. Variation in size was also observed in one isolate of *P. cambivora* whose sporangia were subsequently found to measure 38 x 27µm and 74 x 50µm. This seems to be consistent with the suggestion of BUMBIERIS (Pers. Comm.) that the first sporangia formed are sometimes different in size from those produced later. Further, the conditions of

TABLE 4. Mean value and range of length, breadth, Length/Breadth, and pore diameter of the Sporangia of Phytophthora.

Species	Isolate No.	Length (L) (μm)	Breadth (B) (μm)	L/B	Pore diameter (P) (μm)
P. cinnamomi	8	50 (24-82)	35 (21-48)	1.4 (1.1-2.1)	9 (5 -12)
	36	52 (22-92)	35 (18-53)	1.5 (1.2-1.9)	9 (5-15)
	93	45 (24-89)	31 (17-56)	1.5 (1.1-1.8)	10 (7-15)
	102	61 (40-73)	46 (33-55)	1.3 (1.1-1.8)	10 (6-15)
	51	52 (33-62)	39 (26-51)	1.3 (1.2-1.7)	10 (5-15)
	103	57 (26-73)	46 (22-55)	1.3 (1.1-1.7)	10 (5-15)
	DAR19881	62 (29-81)	43 (27-55)	1.4 (1.1-2.1)	12 (5-18)
	DAR25999	55 (40-77)	39 (27-51)	1.4 (1.1-2.3)	[illegible] (4-15)
	T240	54 (37-81)	38 (26-55)	1.4 (1.2-1.8)	10 (7-15)
	3477	51 (31-62)	38 (29-62)	1.4 (1.2-1.6)	10 (5-15)
	3392	57 (48-70)	43 (33-53)	1.3 (1.2-1.5)	10 (6-15)
	SC50	48 (31-71)	33 (26-44)	1.5 (1.1-2.2)	10 (5-15)
	SC90	56 (37-77)	38 (26-48)	1.5 (1.2-1.7)	10 (6-15)
P. cryptogea	S111	49 (27-65)	36 (22-45)	1.4 (1.1-1.5)	9 (8-12)
	S121	48 (37-66)	31 (22-38)	1.6 (1.1-2.2)	11 (8-15)
	31	47 (33-73)	32 (26-40)	1.5 (1.1-2.5)	9 (5-15)
	91	49 (26-66)	33 (15-44)	1.5 (1.1-2.0)	9 (7-11)
	104	50 (34-62)	34 (22-44)	1.5 (1.2-1.8)	10 (8-12)
	105	50 (26-62)	38 (18-48)	1.3 (1.1-1.6)	10 (6-15)
	P7	51 (44-66)	37 (26-44)	1.4 (1.1-1.8)	10 (5-13)
	DAR17095	47 (29-70)	29 (18-40)	1.7 (1.1-2.6)	11 (5-18)
	DAR24233	52 (40-66)	37 (29-48)	1.4 (1.2-1.7)	10 (5-15)
P. cambivora	S104	47 (22-63)	31 (17-41)	1.5 (1.2-2.3)	10 (7-14)
	82	74 (48-95)	50 (33-66)	1.5 (1.2-2.0)	14 (11-18)
	WA1390	55 (44-77)	42 (29-55)	1.4 (1.1-1.7)	13 (9-18)

experiment influence enormously the character size (LEONIAN and GEAR, 1929; TUCKER, 1931; CHITZANIDIS and KOUYEAS, 1970). Sporangia of all isolates of *P. cinnamomi*, *P. cryptogea* and *P. cambivora* in this study were non caducous and exhibited no pedicel or this was irregular and very difficult to measure. Of these two characters, sporangium caducity would seem to be more stable ■ character than pedicel length. On the other hand AL-HEDAITHY & TSAO (1979) in a study with isolates of 7 species of *Phytophthora* including *P. cinnamomi*, clearly showed that the degree of caducity alone has questionable diagnostic value and that it should be determined only if both the degree of caducity and uniformity in pedicel length are considered.

Sporangial germination

Over the period of observation (4-5 days from the moment cotyledons were floated on the water covering the cultures) only the indirect type of germination of the sporangium (i. e. by zoospores) was observed for *P. cinnamomi* and *P. cambivora*. In *P. cryptogea* the indirect type was also frequent but some sporangia (particularly those with a vacuole) exhibited the direct germination, i. e. by germ tube. No vacuolated sporangia were seen to form zoospores which is consistent with previous findings (GERRETTSON-CORNELL, 1979). *P. cryptogea* showed four different types of zoospore release. Zoospores were formed most frequently within the sporangium and spewed out singly, in rapid succession. Quite often, as already observed in *P. cinnamomi* from Ourimbah State Forest (GERRETTSON-CORNELL, 1973), the sporangium expelled the whole protoplasm as a shapeless mass which broke into single units immediately after release. Less frequently the protoplasm was held at the mouth of the sporangium for a few seconds; from this, small portions of protoplasm separated in regular succession from it and gave rise to one or even two zoospores. On other occasions the sporangium expelled the protoplasm as a whole mass of individualised cells and this moved around until it broke into groups of elements stuck together and eventually into single units (GERRETTSON-CORNELL, 1979). On one occasion, three minutes elapsed from the moment this mass was ejaculated and its breakup into single zoospores. In *P. cinnamomi*, the first two types of zoospore formation were most frequently observed but the other two also occured. The second and third methods seemed to occur more frequently in *P. cambivora*.

Shape of the sporangium

Some of the final conclusions of a study designed to assess the importance of this character in the identification of *Phytophthora* spp. (GERRETTSON-CORNELL, 1980) are summarized. This work showed that although the presence of certain sporangial shapes can be more indicative of some species of *Phytophthora* than others, the same shapes can be found in the latter although to a lesser extent. Moreover, there are shapes which are common to the three species *P. cinnamomi*, *P. cryptogea* and *P. cambivora*. Consequently the sporangial shape cannot be considered a character of primary importance in the identification of *Phytophthora* but only as a supplementary test.

DISCUSSION

This study has shown the existence of some variability among isolates of the same species of *Phytophthora* for a few characteristics such as the size of the sporangia, the presence or absence of swellings. In general however, there was reasonable uniformity within each species. For example, on CMA all isolates of *P. cinnamomi* had a mycelium almost entirely coralloid. Other examples, under the experimental conditions, were the general lack of chlamydospores in *P. cambivora* and *P. cryptogea* on CMA and V-8 agar and the prevailing incapacity to form oogonia homothallically, consistently with other people's work (TUCKER, 1931; FREZZI, 1950; GRENTE, 1961; WATERHOUSE, 1963). This study also confirmed the occurence of homothallism in *P. cambivora*, in the same isolate A2 already described (GERRETTSON-CORNELL, 1977).

Formation of intercalary swellings in large clusters of a net-type configuration at the edge of cotyledons under water was confirmed in all isolates of *P. cambivora*. These swellings were identical to those formed by *P. cryptogea*.

For the first time, intercalary swellings were also observed within the botryose clusters of swellings in *P. cinnamomi*.

Colonies of *P. cinnamomi* and *P. cambivora* on CMA appeared very similar. The scanty aerial mycelium was formed from a few tubular hyphae whereas the substrate mycelium was coralloid. That of *P. cambivora* was formed of more flexuous hyphae and exhibited clusters of «markedly» swollen coralloid hyphae. However these may also be found in certain isolates of *P. cinnamomi*. More definite differences between *P. cinnamomi* and *P. cambivora* resulted on 2% V-8 agar where all isolates of *P. cinnamomi* produced botryose, yellowish-brownish thin-walled swellings and/or chlamydospores whilst *P. cambivora* could only form, at times, a few, sparse hyaline-greyish swellings.

The mycelium of *P. cryptogea* on CMA varied from being formed almost exclusively of tubular hyphae or tubular hyphae with some coralloid hyphae. On V-8 agar, the hyphae were prevalently tubular. The presence of few, small clusters of intercalary swellings (in some isolates), the constant absence of sporangia and oogonia, on solid media, the formation at times of few sporangia, sparsely, non papillate, often with a central vacuole may be indicative of this species of *Phytophthora*. All isolates of *P. cryptogea* under water and in the presence of cotyledons were characterised by a «rich» production of clusters of intercalary swellings.

CONCLUSIONS

The morphology of the isolates of *Phytophthora* has been determined and despite the limitations imposed by the small number of *P. cambivora* examined, the following characteristics under the experimental conditions used are consi-

dered to be of primary importance for the identification of *P. cinnamomi*, *P. cryptogea* and *P. cambivora* :

1. Prevailing heterothallism, amphigenous antheridium and a prevailing lack of sporangia on solid media.
2. The oogonium wall, either smooth or bullate.
3. Lack of a papilla in the sporangium, i. e. apical hyaline thickening < 3-3,5 μm thick.
4. Pore diameter > 7 μm.
5. Sporangia non deciduous.
6. Ability to form botryose swellings or intercalary swellings directly on solid media or in the presence of water.
7. Presence or absence of chlamydospores.

The following characteristics are considered to be of lesser importance and are used as a supplementary test.

1. The texture of the mycelium on CMA.
2. The presence of particular predominant sporangial shapes and the frequency by which they occur.

Minimal taxonomical importance is attributed to the size of the sporangia because of their variability. Similarly, the branching of the sporophore and the method of release of the zoospores are features which appeared to be too erratic to be of any taxonomical value for the identification of these *Phytophthora* spp.

Under the conditions of experiment and by combining these observations on CMA and V-8 media with those of WATERHOUSE (1963), the following key for the identification of *P. cinnamomi*, *P. cryptogea* and *P. cambivora* is suggested.

KEY

- Sporangia and oogonia usually not formed in single culture. Sporangia formed in the presence of liquid media, non-papillate (papilla < 3-3,5 μm), pore size > 7 μm, non-deciduous. Oogonia formed heterothallically, antheridium always amphigynous.
  - Sparse (sessile or terminal) and «botryose» swellings, and chlamydospores formed. Mycelium chiefly coralloid on CMA. . . . . *P. cinnamomi*
    - Botryose swellings not formed, chlamydospores not formed.
      - Bullate as well as smooth oogonia formed in paired cultures with *P. cambivora* and *P. parasitica*, in particular. Mycelium, on CMA, rich in swollen, either coralloid or not, hyphae. Net-like clusters of intercalary swellings may be formed under water with or without cotyledons. Some sessile and/or terminal swellings may be present. Sporangia may exhibit a «markedly» round apex, they may even be conical with a pointed apex. . . . . *P. cambivora*

- Mycelium composed of tubular hyphae with or without coralloid hyphae. Net-like clusters of intercalary swellings formed with and (but only at times) without water. Sporangia readily formed under water, either obpyriform and/or of various other shapes, often vacuolated. . . . . *P. cryptogea*

Compared with WATERHOUSE (1963), the above key has the advantage of not using the character «size» of the sporangia as a preliminary and important discriminatory test. Further it refers to specific conditions of experimentation and includes some additional characteristics such as the ability of some isolates of *P. cambivora* on V-8 to form intercalary swellings under water with cotyledons (and even without in some cases). Larger variation in the branching of the sporophore was observed than that described by WATERHOUSE (1963) for the above three species of *Phytophthora*.

P. cinnamomi form oogonia when paired with the opposite compatibility type as well as with *P. cambivora* and *P. cryptogea*. Bullate oogonia in *P. cambivora* are formed, besides with its opposite type, by pairing it with *P. parasitica* and *P. cinnamomi* (WATERHOUSE, 1954, 1963; GRENTE, 1961; CHITZANIDIS and KOUYEAS, 1970; SHEPHERD, 1978 a, b). *P. cryptogea* yields oogonia with its opposite compatibility type and with *P. cinnamomi* A1 and A2. In particular the work by SHEPHERD (1978 a, b) provided detailed information on the mating behaviour of Australian isolates of *Phytophthora*.

This study has shown the immense difficulty of identifying *P. cambivora* when there is no possibility of mating it, and its identity could only be suspected from the general description of the mycelium. Furthermore *P. cambivora* showed to be closer to *P. cryptogea* than to *P. cinnamomi*. For example, they both failed to form chlamydospores and the typical botryose swellings of *P. cinnamomi*. At the same time both species were able to produce intercalary swellings in net-like structures. Other similarities between these two *Phytophthora* species with regard to the shape of the sporangium were observed (GERRETSSON-CORNELL, 1980).

There is chaos to some extent in the genus *Phytophthora*. WATERHOUSE's Key (1963), although of great importance in the past, suffers from some limitations in certain groups such as Nos 5 and 6. FREZZI's (1950) key, although more precise, is based only on 12 species of *Phytophthora*. The absence of species such as *P. cambivora* in it limits its application. Furthermore the existence of isolates with characteristics of one, two and even three species of *Phytophthora* recently established by the author in Australia adds new confusion to that already existing. These could be hybrids or even different strains of the same species or indicate that different sorts of grouping rather that the present scheme based on species alone could be adopted.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is indebted to Messrs. John WALKER, Biological and Chemical Research Institute, Rydalmere, N.S.W., D.W. EDWARDS, Group Leader, Biology and Mrs Marcia LAMBERT, Chemistry Section for helpful comments on this paper.

Mrs. Anne MUSH is also acknowledged for her statistical work. Those who gave isolates of *Phytophthora* and whom are listed in Table 1, are also kindly acknowledged.

BIBLIOGRAPHY

AL-HEDAITHY S.S.A. and TSAO D.H., 1979 - Sporangium pedicel length in *Phytophthora* species and the consideration of its uniformity in determining sporangium caducity. *Trans. Br. mycol. Soc.* 72 : 1-13.

BLACKWELL E., 1949 – Terminology in *Phytophthora*. *Mycological Papers* No 30. The Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

BUMBIERIS M., 1974 – Characteristics of two *Phytophthora*. *Aust. J. Bot.* 22 : 655-660.

CHITZANIDIS A. and KOUYEAS H., 1970 – Notes on Greek species of *Phytophthora*. *Annls. Inst. Phytop. Benaki*, N.S. 9 : 267-274.

FREZZI M.J., 1950 – Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. *Ministerio de Agricultura y Ganaderia*, Buenos Aires.

GERRETTSON-CORNELL L., 1973 – A preliminary study of the morphology of *Phytophthora cinnamomi* Rands from Ourimbah S.F. (Wyong.) *Inf. Bot. Ital.* 5 : 78-82.

GERRETTSON-CORNELL L., 1976 – Effect of different methods of water demineralization on the recovery of *Phytophthora cinnamomi* Rands by lupin baiting. *Phyton* 34 : 85-87.

GERRETTSON-CORNELL L., 1977– Preliminary results of a study of the sexuality in *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis. *Phyton* 35 : 153-157.

GERRETTSON-CORNELL L., 1979 – Notes on the morphology of five isolates of *P. cryptogea* from Australia. Accepted for publication in *Phyton*.

GERRETTSON-CORNELL L., 1980 - Submitted for publication.

GRENTE J., 1961 – La maladie de l'encre du chataigner. *Ann. Epiphyties*, 12: 25-59.

LEONIAN L.H. and GEER H.L., 1929 – Comparative value of the size of *Phytophthora* sporangia obtained under standard conditions. *J. Ag. Res.* 39 : 293-311.

MARKS G.E. and KASSABY F.Y., 1974 – Detection of *Phytophthora cinnamomi* in soils. *Aust. For.* 36 : 198-203.

NEWHOOK F.J., WATERHOUSE G.M. and STAMPS D.J., 1978 – Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary : *Mycological Papers* No 143. The Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

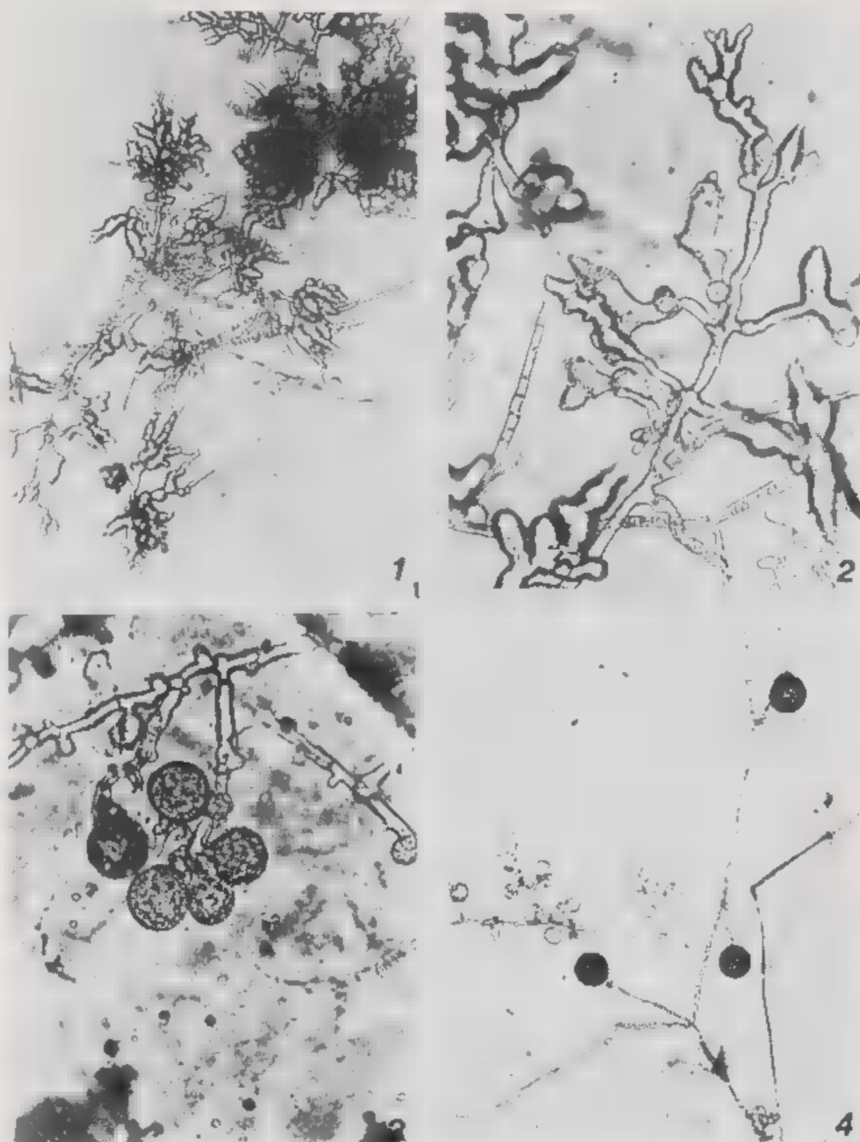
SHEPHERD C.J., 1978 a – Mating behaviour of Australian isolates of *Phytophthora* species. I. Inter and intra-specific Mating. *Aust. J. Bot.* 26 : 123-138.

SHEPHERD C.J., 1978 b – Mating behaviour of Australian isolates of *Phytophthora* species. II. *Phytophthora cinnamomi*.

TUCKER C.M., 1931 – Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. University of Missouri, Columbia.

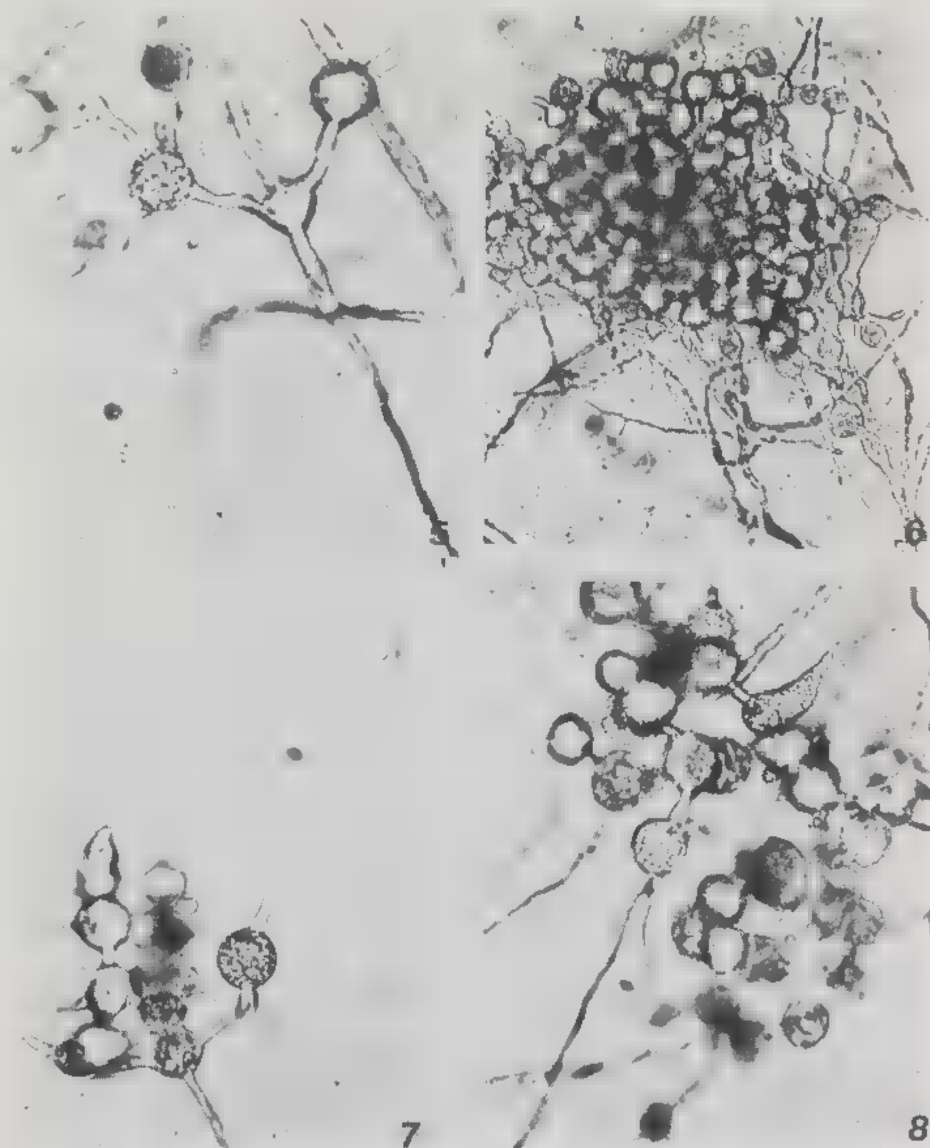
WATERHOUSE G.M., 1954 – Key to the species of *Phytophthora* recorded in the British Isles. *Mycologia* 57.

WATERHOUSE G.M., 1963 – Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers* No 92. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.



Pl. I.

Fig. 1, 2 : *Phytophthora cambivora* : clusters of swollen coralloid hyphae, x 275 and x 440. Fig. 3 : *P. cinnamomi* : botryose swellings and chlamydospores, x 250. Fig. 4 : *P. cinnamomi* : chlamydospores and «small» botryose swellings, x 125.



Pl. II.

Fig. 5, 6 : *P. cryptogea* ; intercalary swellings, x 440 and x 275. Fig. 7, 8 : *P. cambivora* : intercalary swellings, x 440.

L'APPAREIL APICAL DE DEUX DIATRYPALES : ÉTUDE ULTRASTRUCTURALE

par A. PARGUEY-LEDUC et M. C. JANEX-FAVRE *

RÉSUMÉ. – Chez le *Diatrype disciformis* et le *Diatrypella quercina* l'appareil apical des asques est essentiellement constitué par un dôme apical. Dans son pendentif se différencie, chez le *Diatrype disciformis*, un anneau inférieur (= anneau du pendentif). Celui-ci est absent chez le *Diatrypella quercina* qui possède, par contre, dans le sommet de son épiplasme, un tractus constitué par un faisceau divergent de fibrilles groupées par deux et rattaché à sa partie supérieure à un corps sous-apical.

ABSTRACT. – In *Diatrype disciformis* and *Diatrypella quercina* the apical apparatus of asci is mainly constituted by a well developed apical dome. A lower ring (= anneau du pendentif) differentiates in *Diatrype disciformis*; it lacks in *Diatrypella quercina*. The latter species possesses in the upper epiplasm an apical tractus which is composed of divergent paired fibrils and connected to [redacted] «corps sous-apical» at the top.

Chez les Pyrénomycètes à asques unituniqués, CHADEFAUD (1960) reconnaît sept ordres : les Glomérellales, sans anneau différencié, les Diaporthales, Sordariales et Nectriales, à anneau non amyloïde, et les Diatrypales, Xylariales et Hyponectriales, à anneau au contraire amyloïde.

D'après les observations effectuées en microscopie photonique (CHADEFAUD, 1942, 1957; PARGUEY-LEDUC, 1970), l'appareil apical des asques des Diatrypales est essentiellement composé d'un dôme apical, qui se prolonge vers le bas par un pendentif creux où peut se différencier un anneau amyloïde (= anneau inférieur). La partie sommitale de ce dôme forme un coussinet apical, plus ou moins épais et différencié; au-dessous, [redacted] partie axiale constitue un manubrium. Vers le bas un corps ombiliqué peut être enchâssé dans ce manu-

* Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire de Cryptogamie, 9, Quai Saint-Bernard, 75005 Paris.

brium. Au sommet de l'épiplasme peuvent se différencier un corps sous-apical puis un tractus le reliant aux ascospores.

En microscopie électronique*, à notre connaissance, l'appareil apical d'une seule espèce, le *Quaternaria quaternata*, a été jusqu'ici étudié (GRIFFITHS, 1973). Cet auteur décrit, au sommet de l'asque, un épais disque de substance granuleuse dense aux électrons qui se prolonge vers le bas par un anneau également granuleux mais encore beaucoup plus dense; une formation claire et granulo-fibrilleuse en forme de croissant coiffe une évagination épiplasmique. D'après leur disposition, nous pensons pouvoir interpréter le disque de ce *Quaternaria* comme un dôme apical et son anneau comme l'anneau inférieur (= anneau du pendentif) de l'appareil apical des Annellascés (PARGUEY-LEDUC et CHADEFAUD, 1963; PARGUEY-LEDUC, 1977); enfin, la formation en croissant peut correspondre au corps ombiliqué reconnu en microscopie photonique.

Il nous a paru utile de compléter l'étude des asques des Diatrypales en microscopie électronique en examinant ceux de deux espèces : le *Diatrype disciformis* (Hoffm. ex Fr.) Fr. et le *Diatrypella quercina* (Pers.) Nke.

I. L'APPAREIL APICAL DES ASQUES DU *DIATRYPE DISCIFORMIS*

Cette espèce possède des asques longuement pédicellés, dont la partie sporale ne dépasse pas 25-35 x 4-5µm, ce qui rend l'observation de l'appareil apical particulièrement délicate en microscopie photonique. Cela explique les inter-

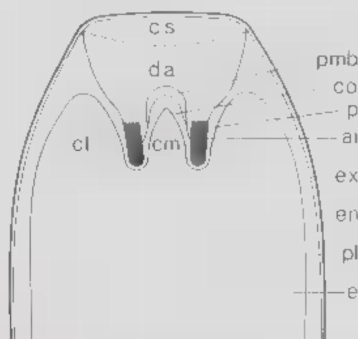


Schéma A. - Coupe longitudinale du sommet d'un asque de *Diatrype disciformis* : schéma synthétique. **ai**: anneau inférieur (= anneau du pendentif); **cl**: couronne épiplasmique latérale; **cm**: évagination épiplasmique médiane; **co**: corps ombiliqué; **cs**: coussinet apical; **da** : dôme apical; **e**: épiplasme; **en**: endoascus; **ex**: exoascus; **p**: pendentif; **pl**: plasmalemme; **pmb**: pseudo-manubrium.

* Nous avons plaisir à remercier N. JAMPSIN et C. FOURNIGAULT pour leur efficace collaboration technique.

prétations différentes qui ont pu en être données (CHADEFAUD, 1942, 1957; SCHRANTZ, 1960).

D'après nos propres observations, le Lugol colore légèrement en bleu un très mince anneau, qui est donc faiblement amyloïde, et l'encre Waterman colore nettement le manubrium, situé au-dessous, et qui est donc de nature chitinoïde.

En microscopie électronique (schéma A et fig. 1) sont reconnaissables :

1) L'anneau apical : de texture granuleuse et très opaque aux électrons il est nettement distinct, et situé entre l'évagination épiplasmique médiane (em) et la couronne épiplasmique latérale (cl). Il est bordé extérieurement par



Fig. 1. — Coupe longitudinale du sommet d'un asque de *Diatrype disciformis*. (fixation : glutaraldéhyde post-osmié; coupe contrastée par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb). Échelle : 0,5 μm.

le pendentif **(p)** et représente donc uniquement l'anneau inférieur **(ai)** (= anneau du pendentif);

2) Les formations du dôme apical : particulièrement volumineuses, elles comprennent :

a) un coussinet apical **(cs)** fibrillo-granuleux, situé à la partie supérieure, immédiatement sous l'exoascus **(ex)**;

b) le dôme apical proprement dit **(da)** lâchement fibrilleux, au-dessous. Sa partie inférieure forme le pendentif **(p)** qui est en continuité avec l'endoascus **(en)** et contient l'anneau;

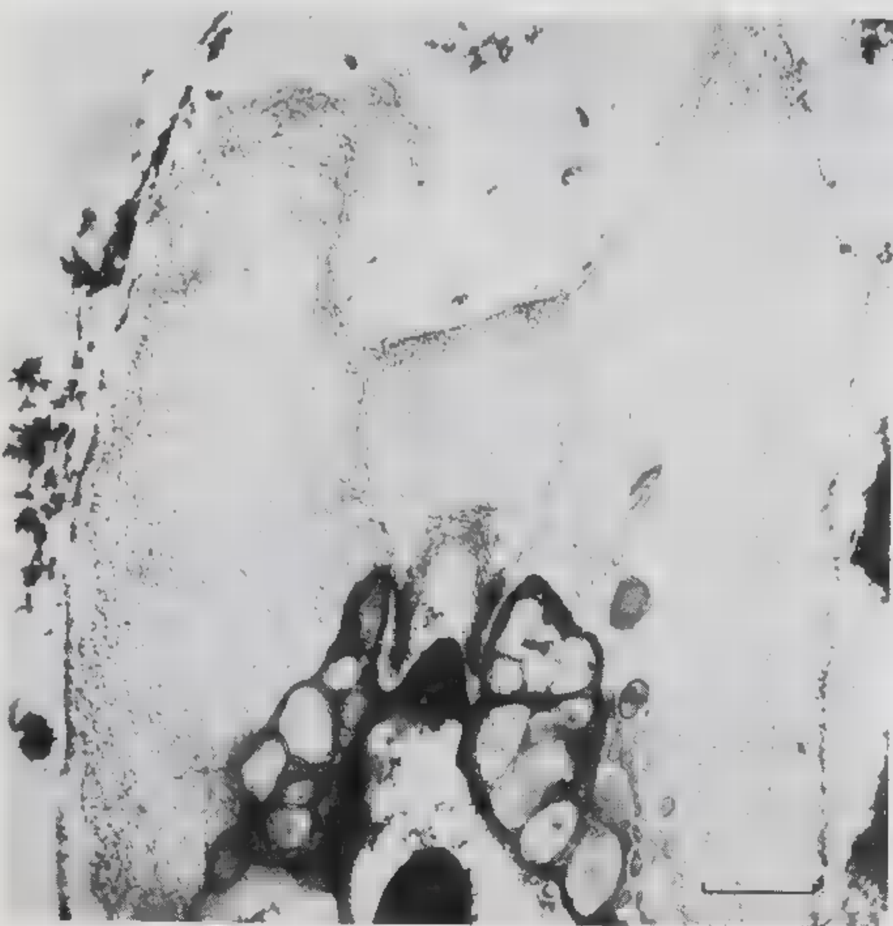


Fig. 2. – Coupe longitudinale d'un asque à sommet invaginé de *Diatrype disciformis*. (fixation : glutaraldéhyde post-osmié; coupe contrastée par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb). Échelle : 0,5 µm.

c) une cloche (apparaissant en forme de croissant en coupe), à texture granuleuse relativement dense. Cette cloche est suspendue à la partie inférieure du dôme apical par des fibrilles divergentes et son bord, aminci, tend à s'appliquer contre la face interne de l'anneau. Cette formation représente un pseudo-manubrium, tel que nous l'avons défini en 1979;
d) un corps ombiliqué, clair, logé dans la partie interne du pseudo-manubrium et coiffant l'évagination épiplasmique médiane.

Dans certains asques, cette évagination est remplie par une substance très dense aux électrons englobant une vacuole autophagique; cette formation correspond peut-être au corps sous-apical, mieux différencié encore chez le *Diatrypella quercina* étudié plus loin.

Nous avons pu fréquemment observer des asques à sommet invaginé (fig. 2). En réalité, il ne s'agit pas d'une véritable invagination : en effet, le volume du dôme apical demeure inchangé et c'est l'extrémité de la paroi ascale qui se développe progressivement vers le haut, en dépassant largement le sommet du dôme au stade final.

II. L'APPAREIL APICAL DES ASQUES DU *DIATRYPELLA QUERCINA*

En microscopie photonique, cette espèce a été étudiée de façon précise par CHADEFAUD (1957, 1960), qui reconnaît dans l'appareil apical de ses asques les formations suivantes :

- un coussinet apical;
- un manubrium bien développé, qui le prolonge vers le bas et enserre dans sa base un corps ombiliqué;
- un corps sous-apical, logé dans la partie sommitale de l'épiplasme axial et prolongé vers le bas par un tractus rattaché à la première ascospore. De plus, les bords du dôme apical forment des replis internes. La coloration par le Lugol ne révèle pas la présence d'un anneau.

En microscopie électronique sont reconnaissables (schéma B et fig. 3) :

1) Les formations du dôme apical :

a) un coussinet apical **(cs)** à texture réticulée, irrégulièrement délimité par un exoascus **(ex)** très mince;
b) le dôme apical proprement dit **(da)** qui lui fait suite vers le bas. En forme de cylindre plein dans sa moitié supérieure, il est évidé en son centre dans sa moitié inférieure. Celle-ci, logée entre l'évagination épiplasmique médiane **(em)** et la couronne épiplasmique latérale **(cl)** constitue le pendentif **(p)**. Le dôme apical présente une texture homogène : il est dans sa totalité constitué par des fibrilles disposées en strates horizontales irrégulières.

Il est à remarquer que dans le dôme apical proprement dit et dans son pendentif, aucune substance dense aux électrons ne se dépose sur les fibrilles et qu'en conséquence il ne se différencie ni anneau supérieur ni anneau inférieur.

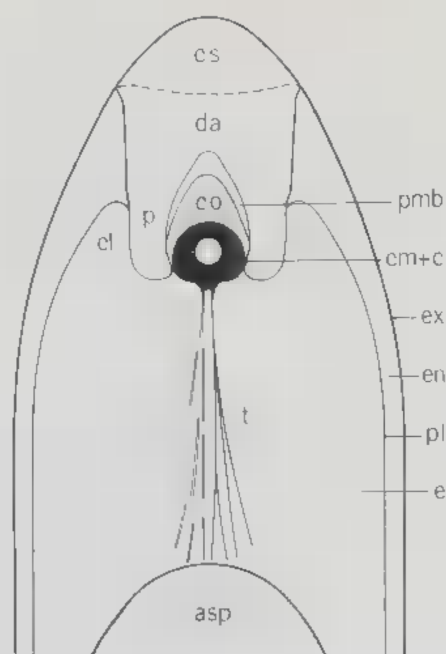
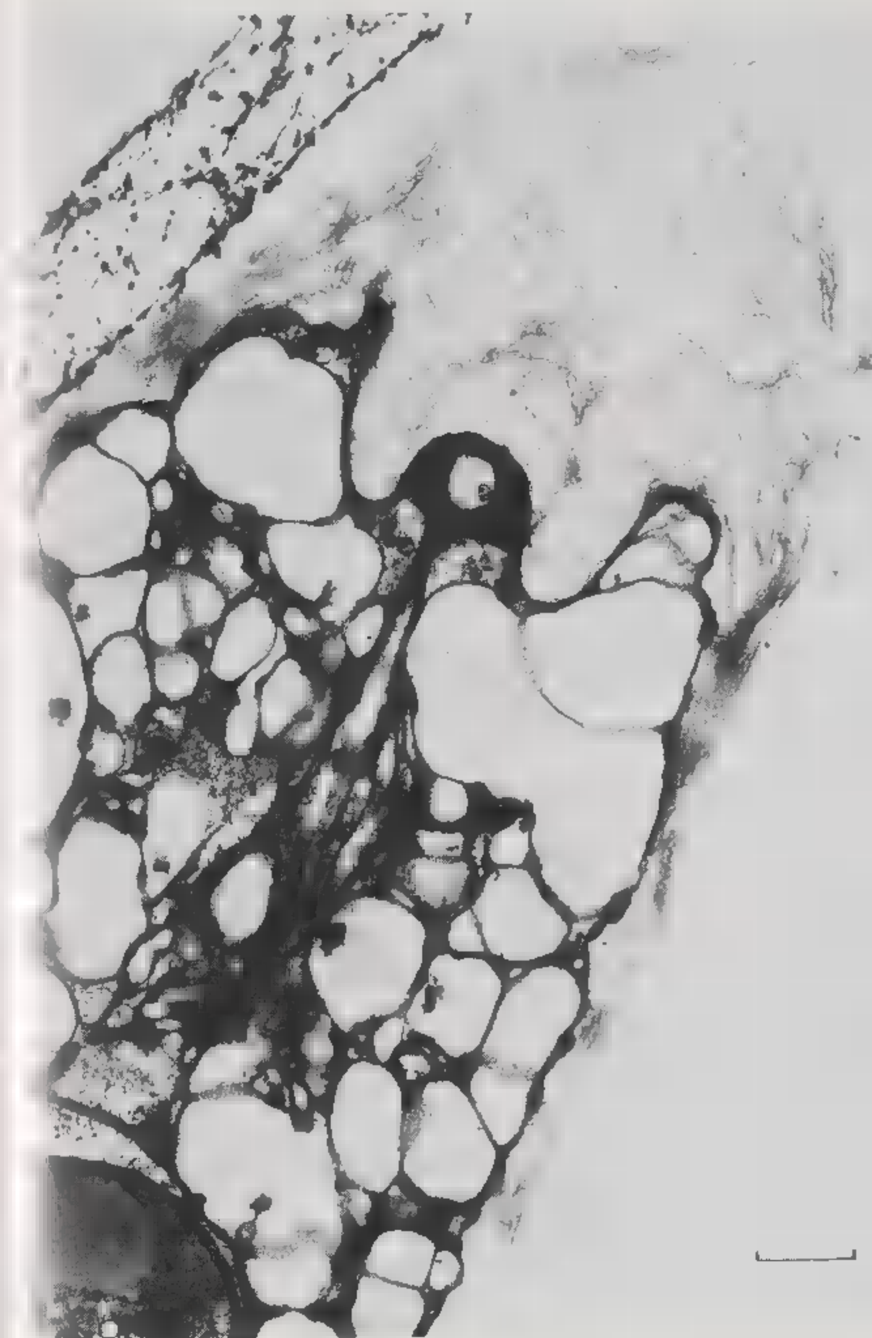


Schéma B. — Coupe longitudinale du sommet d'un asque de *Diatrypella quercina* : schéma synthétique. **asp**: ascospore; **c**: corps sous-apical; **cl**: couronne épiplasmique latérale; **cm**: évagination épiplasmique médiane; **co**: corps ombiliqué; **cs**: coussinet apical; **da**: dôme apical; **e**: épiplasme; **en**: endoascus; **ex**: exoascus; **pl**: plasmalemme; **pmb**: pseudo-manubrium; **t**: tractus.

c) un pseudo-manubrium (**pmb**) en forme de cloche, à texture réticulée.

2) Les formations annexes de l'appareil apical. Dans le sommet de l'épiplasme on reconnaît, comme chez le *Diatrype disciformis*, une couronne latérale (**cl**) et une évagination médiane (**cm**). Celle-ci est occupée par un corps sous-apical (**c**) semi-globuleux particulièrement dense aux électrons et contenant une vacuole autophagique. Ce corps est en continuité avec le plasmalemme. Vers le bas, il se prolonge par un tractus (**t**) complexe, formé de fibrilles groupées par deux, très denses aux électrons. Ces fibrilles appariées se divisent plusieurs fois; leurs rameaux divergent dans l'épiplasme sommital et se terminent en général au niveau de la première ascospore.

Fig. 3. — Coupe longitudinale du sommet d'un asque de *Diatrypella quercina*. (fixation : glutaraldéhyde post-osmié; coupe contrastée par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb). Échelle : 0,5 μm.



III. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les asques des trois espèces de Diatrypales observées en microscopie électronique (*Quaternaria quaternata*, GRIFFITHS, 1973, *Diatrype disciformis* et *Diatrypella quercina*) présentent des appareils apicaux très comparables.

Les formations du dôme apical y sont prépondérantes. Le coussinet apical présente une texture semblable chez les trois espèces. Le dôme apical proprement dit, de forme identique, montre par contre une texture différente : granuleuse chez le *Quaternaria*, fibrillo-granuleuse chez le *Diatrype* et fibrilleuse, avec une stratification horizontale irrégulière, chez le *Diatrypella*.

De plus, l'anneau inférieur, différencié dans le pendentif chez le *Quaternaria* et le *Diatrype*, fait défaut chez le *Diatrypella*. Chez cette espèce en effet n'est visible, à l'emplacement potentiel de cet anneau, que la matrice qui devrait recevoir les dépôts.

Ainsi les observations en microscopie électronique permettent de mieux comprendre l'organisation de l'appareil apical du *Diatrype disciformis* et du *Diatrypella quercina*. La volumineuse masse sommitale interprétée comme un manubrium (CHADEFAUD, 1957 et 1960; SCHRANTZ, 1960) est en fait le dôme apical. En effet, sa structure est identique à celle du pendentif, nettement identifiable, qui lui fait suite vers le bas. Le pseudo-manubrium est, au contraire, réduit à sa partie inférieure et ne perfore pas le dôme de bas en haut, comme nous l'avions vu précédemment chez le *Coniochaeta ligniaria* (PARGUEY-LEDUC et JANEX-FAVRE, 1979). Enfin, les replis des bords du dôme apical, observés en microscopie photonique, n'ont pas été retrouvés en microscopie électronique.

Par contre, les trois espèces étudiées présentent, comme cela avait déjà été vu en microscopie photonique, un corps ombiliqué en forme de cloche coiffant l'évagination épiplasmique médiane et occupant, du moins chez le *Diatrype disciformis* et le *Diatrypella quercina*, la face interne du pseudo-manubrium.

Les formations annexes de l'appareil apical, logées dans l'épiplasme, n'ont été observées que chez le *Diatrypella*, en microscopie électronique comme en microscopie photonique (CHADEFAUD, 1957). Elles comportent un tractus, formation déjà observée en microscopie électronique chez la Sordariale *Coniochaeta ligniaria*. Ce tractus se présente toutefois différemment : chez le *Coniochaeta*, en effet, il a la forme d'un sablier et il est constitué par des faisceaux irréguliers de fibrilles épaisses tandis que chez le *Diatrypella* ses fibrilles, régulièrement associées par deux, se divisent en branches divergentes à partir d'un corps sous-apical qui occupe l'évagination épiplasmique médiane. Cette structure n'avait pas pu être reconnue en microscopie photonique où le tractus apparaissait comme une masse unique effilée vers le bas. Un corps sous-apical se rencontre parfois également chez le *Diatrype disciformis* mais il est moins nettement différencié que chez le *Diatrypella* et il ne se prolonge pas par un tractus.

L'appareil apical des asques présente donc une organisation très homogène chez les trois espèces de Diatrypales examinées en microscopie électronique.

Le dôme apical y est particulièrement développé, il l'est d'ailleurs également chez les Diaporthales : *Diaporthe eres* étudié par GRIFFITHS (1973). L'anneau correspond uniquement, comme chez les Xylariales (GREENHALGH et EVANS, 1967; SCHRANTZ, 1970; BECKETT et CRAWFORD, 1973; GRIFFITHS, 1973; STIERS, 1977) à l'anneau inférieur (= anneau du pendentif), mais chez les Diatrypales, comme l'avait déjà indiqué CHADEFAUD (1973), il est très réduit (*Quaternaria quaternata* et *Diatrype disciformis*), et tend même à disparaître complètement (*Diatrypella quercina*).

BIBLIOGRAPHIE

BECKETT A. et CRAWFORD R.M., 1973 - The development and fine structure of the ascus apex and its role during spore discharge in *Xylaria longipes*. *New Phytologist* 72 : 357-369.

CHADEFAUD M., 1942 - Études d'asques II : structure et anatomie comparée de l'appareil apical des asques chez divers Discomycètes et Pyrénomycètes. *Rev. de Mycol.* 7 : 57-88.

CHADEFAUD M., 1957 – Les asques des Diatrypales. *C. R. Ac. Sc. Paris* 244 (13) : 1813-1815.

CHADEFAUD M., 1960 – Les Végétaux non vasculaires (Cryptogamie). Tome I du Traité de Botanique de M. CHADEFAUD et L. EMBERGER. Paris, Masson édit., 1 vol. de XV + 1018 p., 713 fig.

CHADEFAUD M., 1973 – Les asques et la systématique des Ascomycètes. *Bull. Soc. Myc. Fr.* 89 (2) : 127-170.

GREENHALGH G.N. et EVANS L.V., 1967 – The structure of the ascus apex in *Hypoxylon fragiforme* with reference to ascospore release in this and related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 50 : 183-188.

GRIFFITHS H.B., 1973 – Fine structure of seven unitunicate Pyrenomycete asci. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 60 (2) : 261-271.

PARGUEY-LEDUC A. et CHADEFAUD M., 1963 - Les asques du *Cainia incarcerata* (Desm.) von Arx et Muller et la position systématique du genre *Cainia*. *Rev. de Mycol.* 28 (3/4) : 200-234.

PARGUEY-LEDUC A., 1970 - Recherches préliminaires sur l'ontogénie et l'anatomie comparée des ascocarpes des Pyrénomycètes ascohyméniaux. IV. Les asques des Diatrypacées et leurs ascothécies du type «Eutypa». *Rev. de Mycol.* 35 (2/3) : 90-130.

PARGUEY-LEDUC A., 1977 – Les asques des Pyrénomycètes. *Rev. de Mycol.* 41 : 281-338.

PARGUEY-LEDUC A. et JANEX-FAVRE M.C., 1979 – Sur l'appareil apical, à anneau et tractus, du *Coniochaeta ligniaria* (Grev.) Traverso (Sordariale). *Rev. de Mycol.* 43 : 329-340.

SCHRANTZ J.P., 1960 – Recherches sur les Pyrénomycètes de l'ordre des Diatrypales, sensu M. CHADEFAUD, 1957. *Bull. Soc. Myc. Fr.* 76 (4) : 305-407.

SCHRANTZ J.P., 1970 – Étude cytologique, en microscopie optique et électronique, de quelques Ascomycètes. II. La paroi. *Rev. Cytol. et Biol. vég.* 33 : 111-168.

STIERS D.L., 1977 — Structure of the ascus apex in *Hypoxylon serpens*, *Poronia punctata*, *Rosellinia aquila* and *Rosellinia mammiformis*. *Cytologia* 42 : 697-702.

LA MYCOFLORE DES CAROUBES

Ceratonia siliqua L.

par M.J. CHARPENTIÉ* et St. MARAKIS**

RÉSUMÉ. – Relevé floristique portant sur 930 isolements de la mycoflore des caroubes récoltées en Grèce, du sol sous les arbres et du sol des entrepôts. Remarques d'ordre systématique et biologique sur les espèces inventoriées.

INTRODUCTION

Le caroubier est un petit arbre de la famille des Papilionacées qui se développe sur le pourtour de la Méditerranée. Il était très cultivé autrefois par les peuples nord-africains et est-méditerranéens tant pour l'affouragement des animaux que pour l'alimentation humaine. Actuellement la culture du caroubier a beaucoup régressé; cependant, dans certains pays tels que la Grèce, elle demeure un appoint non négligeable pour le bétail.

Le fruit du caroubier est une gousse pendante de 12 à 20 cm, épaisse, coriace, pourvue d'une substance pulpeuse qui sépare les graines, au nombre de 12 à 16. Par fermentation on en extrait une liqueur alcoolique et on exploite également, en pharmacologie, les propriétés antidiarrhéiques de ce fruit.

Les premiers recensements de champignons se développant sur les caroubiers, sont fournis par SACCARDO (1898) qui signale parmi eux *Phyllosticta ceratoniae, Septoria carrubi, Sphaerella ceratoniae*. Plus récemment, quelques phytopathologistes se sont intéressés aux maladies du caroubier.

* Laboratoire de Cryptogamie du M.N.H.N., 12 rue de Buffon, 75005 Paris. - L.A. 257 (C.N.R.S.).

** Calosgourou 3, T.T. 903 Patissia, Athènes, Grèce.

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE *(Cryptog. Mycol.)* TOME 1 (1980).

Le mildiou, *Oidium ceratoniae* a fait l'objet d'une étude de GRANITI en 1958 qui observe que les arbres mâles paraissent plus sensibles que les arbres femelles et les hermaphrodites. MARTELLI (1961) donne un bref aperçu des symptômes de l'anthracnose du Caroubier causée par *Glomerella cingulata*, et DEMETRIADES et al. (1960), s'intéressent plus particulièrement aux fruits du Caroubier attaqués par *Diplodina ceratoniae*. Mais à notre connaissance, aucun auteur jusqu'alors, n'a fait un inventaire détaillé des champignons microscopiques saprophytes des Caroubes récoltées et stockées.

PANTIDOU (1973), recensant les champignons parasites, saprophytes ou mycorhiziques des plantes de Grèce, mentionne pour *Ceratonia siliqua : Coleophoma oleae, Diplodia ceratoniae, Diplosclerophoma ceratoniae, Oidium ceratoniae, Phoma ceratoniae* et *Septoria carrubi*.

Les essais qui sont à l'origine de cet inventaire ont pour objet la production d'une protéine fongique, obtenue par l'action des champignons microscopiques sur les Caroubes; au cours de cette étude, 930 souches de Micromycètes ont été isolées. L'ensemble de la mycoflore ainsi répertoriée fait l'objet d'une discussion quant à sa nature et sa fréquence.

MATÉRIEL

En Grèce, la récolte des Caroubes est fixée à une date précise par le préfet de chaque département. Les caroubes tombées à terre sont récoltées un mois après et entreposées en vue de leur utilisation ultérieure.

Dans le cadre de ce travail, les récoltes ont été faites dans 2 lieux de Crète : Héraclion et Réthymnon. Le premier prélèvement fait en mars 1974, est constitué de 50 échantillons provenant de caroubes moisies ramassées à terre sous les arbres, 60 échantillons à partir des caroubes stockées dans les entrepôts. Au cours de la même récolte, 50 prélèvement sont effectués dans le sol sous les caroubiers et 40 dans le sol des entrepôts. En novembre 1974, dans les mêmes localités, 40 échantillons de caroubes sont prélevés sous les arbres ou dans l'entrepôt et, à partir du sol, 40 prélèvements sont effectués dans les entrepôts et 20 sous les arbres. Une nouvelle récolte est faite au cours de l'été 1978 : l'isolement des microorganismes est alors effectué par une méthode différente (voir paragraphe technique).

Les échantillons de caroubes et les prélèvements de sol sont placés dans des sacs de plastique stériles et expédiés immédiatement au laboratoire pour l'isolement des champignons.

TECHNIQUES

- Les **prélèvements** à partir du sol sous les caroubiers sont faits à une profondeur de 10 cm, ceux effectués dans le sol de l'entrepôt, à 5 cm de la surface.

- Les **milieux de culture** et les méthodes d'isolement ont été très diversifiés en vue de mettre en évidence le plus grand nombre possible de microorganismes :

Czapeck agar, Czapeck enrichi en saccharose (20 g), extrait de malt gélosé à 2%, milieu gélosé à base de foin, milieu osmophile à base de canne à sucre ($(NH_4)_2SO_4$, 7,5 g; NaH_2PO_4, 1,5 g; $MgSO_4\ 7H_2O$, 0,45 g; $FeSO_4\ 7H_2O$, 0,5 g; KCl, 0,15 g; $CaCl_2$, 0,45 g; $ZnCl_2$, 0,03 g; extrait de levure, 3 g; canne à sucre, 30 g; 1 litre d'eau distillée), milieu cellulosique ($(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g; KH_2PO_4, 1 g; KCl, 0,5 g; $MgSO_4\ 7H_2O$, 0,2 g; $CaCl_2$, 0,1 g; extrait de levure, 10 g; cellulose en poudre, 10 g; eau distillée, 1 litre). Les 930 souches isolées sont ensuite entretenues sur un milieu à base d'extrait de caroube obtenu par autoclavage à 121° à 1 atm. pendant 45 minutes, supplémenté avec 3% de sucre non raffiné.

ISOLEMENTS

1. A partir des caroubes moisies

4 g d'échantillon de caroubes moisies sont coupés aseptiquement en morceaux de 4 à 6 mm et posés dans des boîtes de Pétri sur lesquelles on verse 10 ml de milieu à 43°C. Les boîtes sont mises à l'étuve à 20°, 30°, 45°. Les isolements sont faits de 2 à 10 jours après, soit à partir des colonies, soit par prélèvements directs sous la loupe binoculaire, soit par la méthode des dilutions successives effectuées de la façon suivante : une quantité déterminée de la culture est ajoutée à 9 ml de liquide Ringer 1/4 autoclavé, additionné de 0,01% de Tween 80, dans des boîtes universelles. Après mixage de cette suspension mère, des dilutions décimales sont effectuées aboutissant à un nombre de 3 à 6 colonies par boîte pour 1 ml de suspension.

2. A partir du sol

a) méthode des dilutions

A 25 g de sol sec placés dans une éprouvette graduée, on ajoute un milieu malt agar à 0,15 g jusqu'à un volume de 250 ml. Après broyage au Waring-Blendor (50 sec.), 5 ml de cette suspension sont versés dans 45 ml d'eau gélosée à 0,15%; cette dilution est répétée jusqu'à obtention de 3 à 6 colonies par boîte repiquées ensuite en culture pure.

b) ensemencement direct

5 à 15 mg de l'échantillon de sol additionnés d'une goutte d'eau distillée sont placés dans une boîte de Pétri avec 10 ml de milieu de culture à 43°C. Après homogénéisation des boîtes, celles-ci sont placées en étuve aux différentes températures; une fois développées, les colonies formées isolément sont repiquées en culture pure.

c) ensemencement par pipette

25 g d'échantillon de sol, placés dans un erlen de 500 ml avec 225 ml d'eau distillée sont broyés avec un mélangeur magnétique. Pendant la durée de l'opé-

ration, plusieurs prélèvements sont faits avec une pipette de 1 ml dont le contenu est versé dans 10 ml de milieu gélosé.

d) isolement des hyphes

L'échantillon de sol (1 à 1/2 g) est placé dans un bécher, puis mouillé jusqu'à saturation avec de l'eau distillée. Après 4 à 5 minutes, on fait circuler une eau stérile courante; les parties les plus lourdes de la suspension sont décantées. 1 minute plus tard le surnageant est enlevé; cette manipulation est répétée jusqu'à ce que la partie surnageante soit limpide. La partie inférieure, ainsi décantée est distribuée par petites quantités dans de l'eau distillée et examinée à la loupe pour observer les hyphes qui sont ensuite transférées avec une microaiguille dans une goutte d'eau stérile en boîte. Les hyphes séparées les unes des autres sont transportées sur un milieu gélosé à raison de 10 à 20 hyphes par boîte.

e) les Ascomycètes ont été mis en évidence par la méthode de désinfection partielle (WARCUP, 1963)

Pour limiter le développement bactérien pendant les isolements, le pH des milieux a été abaissé à 3,5 en ajoutant 5,7 ml d'acide citrique à 10% pour 100 ml de milieu. Cette technique efficace présente l'inconvénient d'éliminer aussi certains Micromycètes sensibles à un pH aussi bas. C'est pourquoi au cours de la récolte de 1978, le développement bactérien a été contrôlé par addition aux différents milieux de 0,5% de chloramphénicol. Il est donc probable qu'une grande partie de la mycoflore a été mise en évidence. Notons également que les souches ainsi isolées présentent une certaine adaptation au substrat qu'elles contaminent; en effet, les mêmes espèces isolées de différents substrats et cultivées sur un milieu à base d'extrait de caroube, se développent moins bien que les espèces isolées de caroube.

RÉSULTATS

Le Tableau I présente l'inventaire des souches en fonction de l'origine du prélèvement : caroubes moisies, sol de l'entrepôt, sol sous le caroubier et caroubes autoclavées réensemencées spontanément. Il indique la fréquence de chaque espèce par rapport au nombre total de souches isolées (930) mais ne précise par cette fréquence pour chaque origine.

Fréquence et nature des microorganismes isolés

Il apparaît très clairement que les espèces les plus fréquemment isolées (*Aspergillus niger*, *Penicillium frequentans*, *Aspergillus flavus*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium expansum*) sont des moisissures très banales, ubiquistes, qui ne présentent aucune spécificité par rapport au substrat que nous étudions - dans la limite d'une certaine adaptation évoquée au paragraphe «milieux utilisés» -. Signalons tout de même qu'*Aspergillus flavus* peut être à l'origine de très graves accidents dans la mesure où certaines souches de cette espèce peuvent élaborer de l'aflatoxine.

Les espèces moins fréquentes qui contaminent 4 à 5% des lots méritent cependant de retenir notre attention.

- *Aspergillus terreus*, champignon du sol, est également cité sur des graines et sur des débris organiques en décomposition. Sa présence, à la fois sur les gousses et dans le sol, confirme bien les données antérieures. Signalons toutefois que dans tous les isolements observés, cette espèce présente des caractéristiques morphologiques inhabituelles : têtes bi- ou tricéphales prenant naissance sur un conidiophore sinueux. Les cultures elles-mêmes ne sont pas toujours typiques : mycélium stérile abondant, aspect laineux, ocre clair plus ou moins zoné. Mais les phialides dont certaines sont dédifférenciées en filaments, produisent des conidies en colonnes serrées typiques du groupe *terreus*. Les cas de têtes d'*Aspergillus* à aspect «tératologique» sont fréquents et ont été déjà signalés par plusieurs auteurs, cependant cette anomalie semble relativement stable puisqu'elle est observée durant trois mois après plusieurs repiquages successifs.

- *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium* dont l'identification a été confirmée par R.A. SAMSON est un champignon du sol dont la description originale de THOM (1915), souligne le caractère bien marqué. D'après l'auteur, il se rattache au point de vue systématique à la série *purpurogenum* dont il ne diffère que par la présence de sclérotes rouge foncé ou noir. A. STOLK (1973), comparant des souches de *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium* qui ont perdu, au fil des ans, la capacité de produire des sclérotes, les rapproche plutôt de *Penicillium funiculosum* par l'aspect cultural laineux. Les souches de cette espèces que nous avons isolées dégagent une odeur si forte et si caractéristique de pelure de pomme de terre, que nous avons gardé le nom de variété pour les distinguer des autres espèces, *Penicillium funiculosum* et *P. purpurogenum* que nous avons isolées assez fréquemment. Notons enfin que *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium* a été mis en évidence, dans nos essais, à la fois sur caroubes moisies, dans le sol de l'entrepôt et dans le sol sous les caroubiers.

C'est également le cas de *Penicillium funiculosum* dont la fréquence par rapport au nombre total d'isolements est sensiblement identique et dont la répartition se situe soit dans le sol, soit sur des débris végétaux en voie de décomposition, ce que confirment nos essais.

Penicillium purpurogenum est révélé seulement à partir du sol sous les caroubiers; il est en effet un composant fréquent de la mycoflore des sols des régions tempérées, tropicales et subtropicales et aussi un agent de détérioration de nombreux substrats organiques.

Verticillium psalliotae par contre se développe généralement sur des supports bien spécifiques. D'après GAMS (1971), il a été isolé de cultures de champignons, de rouilles, de Truffes, à partir d'insectes morts, de bouses de vaches et de tissu enfoui dans le sol. Sa présence ne semble pas avoir été signalée sur des grains en stockage bien qu'une espèce très proche, *Verticillium fungicola* soit mentionnée souvent sur ce substrat sous le nom de *Verticillium malthousei*.

Dans le travail présent il a été mis en évidence à partir du sol de l'entrepôt

et des caroubes moisies; il est probable qu'il s'est développé d'abord sur les caroubes qui lui offraient un substrat favorable, puis a envahi le sol de l'entrepôt.

Aspergillus carbonarius appartenant au groupe *niger*, probablement moins fréquent que *A. niger* mais très ubiquiste, est signalé par GUPTA (1956) comme agent de la pourriture des grains de raisin en Inde. Sa présence soit dans le sol, soit sur des substrats divers, semble liée à des climats chauds sans que cette condition soit nécessaire. Dans le cas des caroubes, nous l'avons isolé seulement à partir des gousses mais avec une fréquence relativement élevée (4,2); si nous tenons compte du fait qu'il est très proche d'*Aspergillus niger* au point de vue systématique et biologique, nous pouvons évaluer la fréquence cumulée de ces deux espèces à 12% ce qui place les *Aspergillus* du groupe *niger* largement en tête du cortège floristique des caroubes.

Dans le groupe des Mucorales, *Mucor mucedo*, *Rhizopus arrhizus*, *Absidia ramosa* et *Mucor genevensis* sont recensés. Seules les deux premières espèces sont relativement fréquentes, *Mucor mucedo* dans le sol sous les caroubiers et *Rhizopus arrhizus* sur les caroubes. Ces deux espèces très ubiquistes à la fois par leur répartition géographique et les substrats qu'elles envahissent, demandent cependant une humidité relative de l'environnement et une teneur en eau du substrat assez élevées. *Absidia ramosa*, hôte fréquent des graines et *Mucor genevensis*, essentiellement champignon du sol, sont ici isolés du sol de l'entrepôt avec une fréquence très faible.

DISCUSSION

L'origine du prélèvement des différentes espèces isolées nous conduit à faire quelques remarques.

- Les espèces les plus fréquentes sont présentes à la fois sur les caroubes moisies et dans le sol de l'entrepôt (exception faite de *A. niger*, *A. flavus* et *P. expansum*). Autrement dit, la micropopulation de ce sol reflète celle des caroubes. Par contre, la microflore du sol sous les caroubiers est sensiblement différente de celle des caroubes bien que celles-ci séjournent un mois sur le sol avant d'être récoltées. Les prélèvements effectués à 10 cm de profondeur révèlent une micropopulation distincte à l'exception de 3 espèces assez fréquentes: *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium*, *Penicillium funiculosum* et *Penicillium cyclopium*.

Trois espèces seulement se sont développées sur les résidus de caroube exempts de sucres solubles. Ces résidus obtenus par 8 autoclavages successifs, sont laissés à l'air libre pour être ensemencés spontanément. Parmi les nombreuses spores susceptibles de contaminer ces résidus, seules se sont développées «in situ», *Penicillium variabile*, *Penicillium chrysogenum*, mutant blanc instable et *Trichoderma harzianum*. Cette dernière espèce notoirement cellulolytique a trouvé probablement un substrat convenant à ses aptitudes enzymatiques; *Penicillium chrysogenum* quant à lui, a sans doute modifié son métabolisme momentanément ce qui a entraîné une perte provisoire de sa pigmentation. Enfin *Penicil-*

lium variabile dont RAPER et al. (1968) mentionnent la présence sur des papiers humides en stockage et sur amidon, est donc apte à hydrolyser des molécules de polysaccharides.

Des espèces cellulolytiques sont isolées également à partir des caroubes et du sol : *Aspergillus oryzae, A. terreus, Fusarium moniliforme* et *F. solani*. Elles prennent certainement une part active à la décomposition de la cellulose contenue dans les gousses.

Certains micromycètes ont été mis en évidence seulement au cours des derniers isolements effectués avec du chloramphénicol comme bactéricide : *Fusarium oxysporum* var. *redolens, Fusarium solani, Phoma herbarum, Mucor mucedo, Cladosporium cladosporioides* et *Penicillium tardum*. Puisque les isolement antérieurs avaient été effectués en abaissant le pH à 3,5 à 4 en vue d'éliminer les bactéries, nous sommes en droit de nous demander si ces espèces sont sensibles à des pH de cette valeur et si leur développement a pu être inhibé en milieu franchement acide. D'après SMITH et BERRY (1975), le pH optimum de croissance pour les micromycètes se situe entre 5 et 7, avec une tolérance pour des pH assez bas sauf en ce qui concerne les Mucorales dont le développement est particulièrement ralenti par une diminution du pH. PANASENKO (1967) situant entre 2 et 10 les limites de pH dans lesquelles la croissance des micromycètes est possible, mentionne cependant que leur sporulation et leur activité enzymatique se situent dans une fourchette beaucoup plus étroite. Les espèces qui nous concernent, mises en évidence seulement par un milieu faiblement acide ou proche de la neutralité, ne sont pas citées dans les documents que nous avons consultés; il est donc difficile, en l'absence de données précises, de conclure de façon décisive. Cependant, étant donné le grand nombre d'isolements effectués, il est probable que ces espèces se seraient manifestées en milieu acide au cours des isolements antérieurs, si elles n'étaient pas sensibles à un pH bas.

- Bien que les gousses de caroube sur lesquelles ont porté nos essais constituent un support différent de celui des graines proprement dites, notamment par la teneur en cellulose et en lignine, nous pouvons rechercher des similitudes avec le comportement des graines stockées dégradées par les moisissures saprophytes. Ces dernières ont depuis longtemps été répertoriées sur toutes sortes de substrats, blé, maïs, avoine, haricot, lin, sorgho, pois, etc... Leur inventaire n'est pas exhaustif, cependant certaines espèces sont particulièrement inféodées aux graines : *Alternaria, Stemphylium, Helminthosporium, Fusarium, Botrytis, Acremoniella*, pour ne citer que les genres les plus fréquents de la flore du champ, *Penicillium* spp. et *Aspergillus* spp. pour la flore de stockage. Dans le cadre de nos essais et bien que les gousses de caroube séjournent un mois sur le sol et soient ensuite entreposées, nous n'avons pas cherché à étudier l'évolution de la flore en conditions de stockage. Aucune estimation quantitative n'a d'ailleurs été faite. Il est difficile par conséquent de préciser à quel moment de cette évolution ont été faits les prélèvements. Cependant nous remarquons que sont encore présentes des espèces de la flore du champ : *Paecilomyces varioti, Alternaria tenuissima, Fusarium* spp., ainsi que des Mucorales et égale-

Microflore des caroubes

Espèces	C.M.	S.E.	S.C.	C.A.	Fréquence
Aspergillus niger	+	+			9,28
Penicillium frequentans	+	+			7,53
Aspergillus flavus	+				6,98
Paecilomyces varioti	+	+			5,21
Penicillium expansum	+				5,15
Aspergillus terreus	+	+			4,9
Pen. purpurogenum var. rubrisclerotium	+	+	+		4,83
Verticillium psalliotae	+	+			4,5
Penicillium funiculosum	+	+	+		4,42
Mucor mucedo			+		4,31
Penicillium purpurogenum			+		4,23
Aspergillus carbonarius	+				4,2
Fusarium moniliforme	+	+			4
Rhizopus arrhizus	+				3,4
Penicillium cyclopium	+		+		3,2
Aspergillus fumigatus		+			2,7
Alternaria tenuissima	+	+			2,6
Penicillium variabile	+			+	2,15
Penicillium steckii			+		1,6
Aspergillus oryzae			+		1,6
Penicillium chrysogenum				+	1,35
Aspergillus repens		+			1,3
Fusarium solani		+			1,29
Penicillium spinulosum		+			1,2
Penicillium cyaneofulvum	+				1,1
Aspergillus candidus	+				1,1
Cladosporium cladosporioides			+		1,1
Fusarium oxysporum var. redolens		+			1,08
Acremonium strictum		+			0,96
Cladosporium sphaerospermum			+		0,86
Absidia ramosa		+			0,65
Phoma herbarum		+			0,54
Mucor genevensis		+			0,53
Penicillium tardum		+			0,22
Trichoderma harzianum				+	x

C.M.: caroubes moisies; S.E.: sol de l'entrepôt; S.C.: sol sous les caroubiers; C.A.: caroubes autoclavées, réensemencées spontanément.

ment toutes les espèces de la flore de stockage dont l'essor dépendra des conditions hydriques régnant dans l'entrepôt. Quant au *Verticillium psalliotae* qui selon nous n'a jamais été signalé sur des graines, il est probable qu'il se comportera comme une espèce du champ et que ses exigences en eau et son manque de compétitivité au plan de la sporulation, causeront sa disparition progressive au sein des lots entreposés. Mais sa fréquence relativement importante (4,5) sur les caroubes et dans le sol de l'entrepôt, prouve qu'il est un élément non négligeable de la mycoflore de ce fruit. Notons enfin que parmi les espèces xérophiles seul *Aspergillus repens* se manifeste.

CONCLUSION

La mycoflore des gousses de caroubes révèle des similitudes très réelles avec celle d'autres graines déjà étudiées. Les fruits des caroubes en décomposition offrent donc un support biochimique et biologique comparable à celui des graines. Notons cependant qu'une espèce, *Verticillium psalliotae* fait exception. La fréquence avec laquelle elle se manifeste exclut toute coincidence. Il faut donc penser que le substrat que constituent les caroubes est favorable à ce micromycète, plus favorable en tout cas que celui des autres graines testées jusqu'à ce jour.

BIBLIOGRAPHIE

DEMETRIADES S.D., et al., 1960 – Rapport sommaire sur les maladies des plantes cultivées observées en Grèce au cours de l'année 1958. *Ann. Inst. phytopath. Benaki N.S.* 1, 6: 323-329.

GAMS W., 1971 – *Cephalosporium*-artige Schimmelpilze p. 184-186, ed. Gustav Fischer Stuttgart.

GRANITI A., – Appunti serlla «nebbia» del Carrubo in Sicilia. *Ann. Canad. Sci. For.* 7 : 309-328.

GUPTA S.L., 1956 – Occurence of *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom causing grape rot in India. *Sci. and Culture* (Calcutta) 22 : 167-168.

MARTELLI G.P., 1961 - L'anthracnose del Carrubo. *Phytopath. medit.* (I) 3 : 138.

PANASENKO V.T., 1967 – Ecology of microfungi. *Botanical Review* 33 (3) : 189-215.

PANTIDOU M.E., 1973 – Fungus-host index for Greece. Benaki Phytopathological Institute, Athènes.

RAPER K.B., THOM C., 1968 - A manual of the *Penicillia*. Hafner publishing Company, Baltimore.

SACCARDO P.A., 1898 – *Sylloge Fungorum* 13 : 292.

SMITH J.E., BERRY D.R., 1975 – The filamentous Fungi I (Industrial Mycology) p. 30 et 140. Edward Arnold ed., London.

STOLK A.C., 1973 – *Penicillium donkii* sp. nov. and some observations on sclerotial strains of *Pen. funiculosum*. *Persoonia* 7 (2) : 333-337.

THOM C., 1915 – The *Penicillium luteum-purpurogenum* group. *Mycologia* 7 : 141-142.

WARCUP J.H., 1963 – Occurence of dormant ascospores in soil. *Nature* 197 : 1317-1318.

DEVELOPMENTAL MORPHOLOGY OF ASCOMYCETES

VI. THERMOASCUS AURANTIACUS

par C.V. SUBRAMANIAN and C. RAJENDRAN*

This paper is the sixth in a series on the developmental morphology of the Ascomycetes and deals with *Thermoascus aurantiacus* Miehe. The culture used in the present study is not the type, and it was isolated from saw dust from Parana pine; it was received from the Commonwealth Mycological Institute, Kew, England, under the No IMI 67936. This was one of the cultures studied by APINIS (1967) along with culture No. IMI 91787 which was designated by him as the neotype.

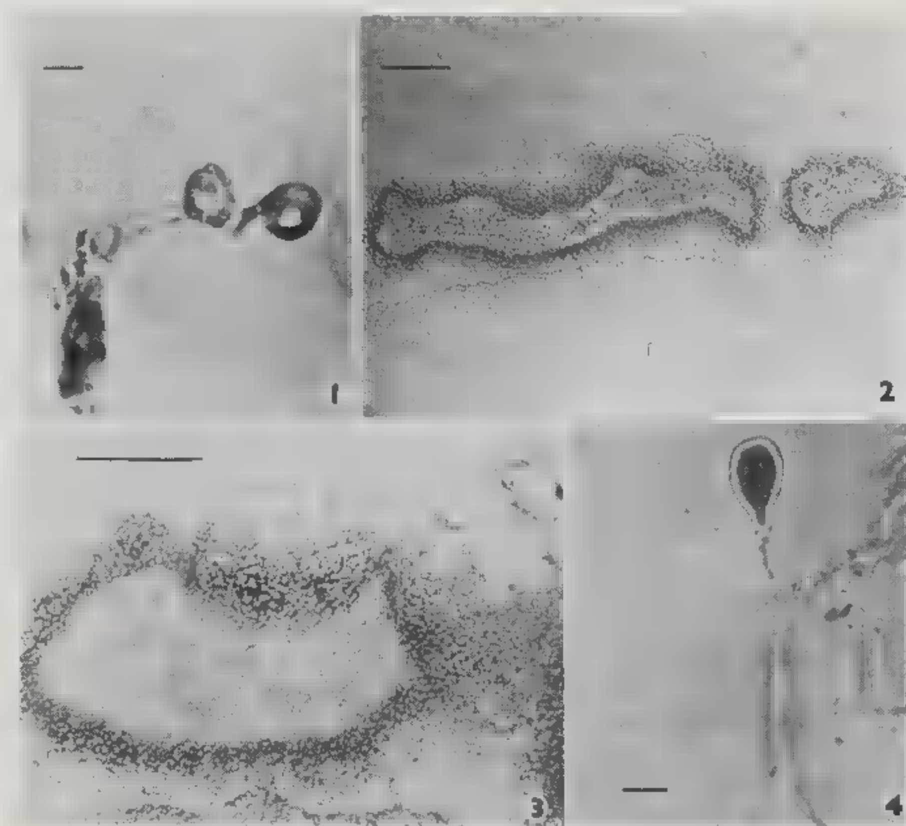
The fungus was grown on YpSs agar medium and the various stages of the development of the fruit bodies were studied by making tease mounts stained with 0.1% lactofuchsin as recommended by CARMICHAEL (1955) and sectioning the materials by the paraffin method as described by JOHANSEN (1940) and PURVIS, COLLIER and WALLS (1964). Tease mounts were also used in the study of the anamorph. For the study of the germination of ascospores methods described earlier (SUBRAMANIAN and RAJENDRAN, in press) were followed.

DESCRIPTION OF THE FUNGUS

Colonies on YpSs agar medium growing rapidly at a temperature of 38-40°C, attaining a diameter of 7-8 cm in two or three days, white at first, later becoming light grey-buff. Surface growth mucoraceous, becoming granular and pale yellow, then to orange buff, bright brick-red; and finally almost brown in age (within the next two or three days). Exudate present on the surface of the culture as shining droplets.

Memoir No. 257 from the Centre for Advanced Study in Botany, University of Madras.
* Centre for Advanced Study in Botany, University of Madras, Madras-600 005, India.

Hyphae hyaline, closely to remotely septate, up to 15µm wide (fig. 5, j, k, m, n, q). Hyphal fusions often observed (fig. 5, 1, p). Raquette hyphae present (fig. 5, o). «Ascocarp» is an ascostroma. Ascostroma prosenchymatous, formed by the aggregation of masses of narrow hyphae. Ascogonia curled, numerous scattered within the stroma. Mature ascocarps (= ascostroma) variously shaped mostly spherical to elongate (fig. 4, a; Pl. I, fig. 3), single or clustered or confluent, light brown in colour, variable in size, up to 1.3 mm x 250µm, with an outer covering composed of pseudoparenchymatous tissue of irregularly arranged cells. Asci formed from croziers in groups, irregularly disposed, subglobose to ovate, 8-spored, 8-13.5 x 7-9.5µm (fig. 3, c-e). Ascospores hyaline, elliptical, slightly rough, 4.5-6.5 x 3.5-5µm (fig. 4, e, f). Gangliar conidia present, pro-



Pl. I. - *Thermoascus aurantiacus* - (Échelle: 10µm). Fig. 1: ascogonial curls (teased out). Fig. 2 & 3: Stages in the development of ascostroma. Note cavity in each ascostroma within which asci develop. Note clear pseudoparenchymatous nature of the tissue surrounding the cavity in fig. 3. Fig. 4: a mature gangliar conidium.

duced terminally on long or short hyphal branches, single or in clusters of 2 or 3, clavate or almost subglobose, smooth, thick-walled, up to 20 x 8 μm.

DEVELOPMENT OF THE TELIOMORPH

The teliomorph appears 2 or 3 days after the fungus is inoculated on YpSs agar medium and, being thermophilic, the culture needs to be incubated at a temperature of 38-40°C. Initially, small cushion like hyphal masses (prosenchymatous stroma) are formed by the aggregation of groups of profusely branched interwoven narrow hyphae produced by the ordinary vegetative mycelium (fig. 1, a). During the process, a marked change in the appearance of the culture is observed - the white to light grey-buff mucoraceous mycelial colony becoming granular and almost pale yellow.

A few deeply staining, smooth hyphal extensions now arise from some of the hyphal branches within each of these hyphal masses and become curled and septate; these are the ascogonia (fig. 1, b-i; Pl. I, fig. 1), and the hyphal mass with the ascogonia forms the rudiment of an ascostroma (fig. 1, a). The number of the turns in each of these ascogonial curls may vary from 1-3, and these curls are arranged somewhat loosely. Septation of these ascogonial curls may occur at an early stage in the development. No antheridium was seen. Also, no evidence of fusion between any of the ascogonial curls and the neighbouring hyphae was obtained. However, in certain cases, the ascogonial curls were found to be twisted around hyphal branches in the stroma.

With further development, the hyphae in the peripheral part of the prosenchymatous stroma become densely branched and knotted, tightly arranged and finally pseudoparenchymatous, forming an outer covering (fig. 2, a; Pl. I, fig. 2).

The next stage in development is marked by the formation of croziers and asci. As the ascogonia develop further, protuberances arise from some of the cells of the ascogonial curls; these protuberances elongate and become bent to form hook-like structures, the croziers (fig. 2, b-e). Formation of two septa divides each crozier into three cells; the basal, the penultimate and the tip cells (fig. 2, f). In some cases, before septation occurs, each hook produces one or two short extensions which may in turn develop into croziers (fig. 2, g, h). These croziers also become three-celled by septation. Invariably, the penultimate cell of each of these croziers proliferates to produce secondary croziers and a repetition of this process may lead to the formation of tertiary and quaternary croziers, etc. (fig. 2, i). After some time further croziers are not formed and the penultimate cells of the croziers already formed enlarge and become asci (fig. 2, o).

Sometimes, the protuberances produced on the ascogonial curls may not produce croziers as described above. Instead, loop-like structures may be formed (fig. 2, j, k) presumably by fusion of protuberances formed from adjacent cells or one protuberance from one cell of the ascogonial coil becoming bent and

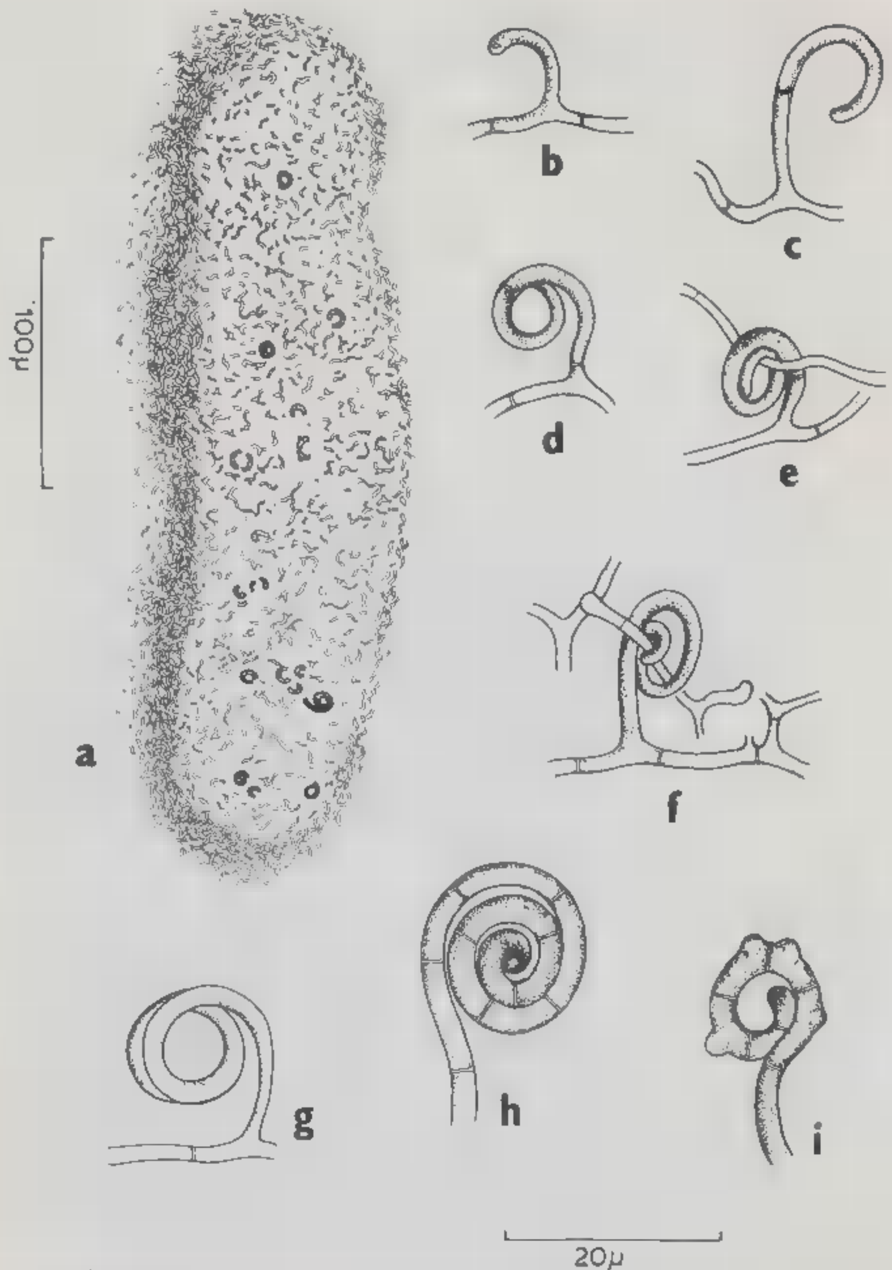
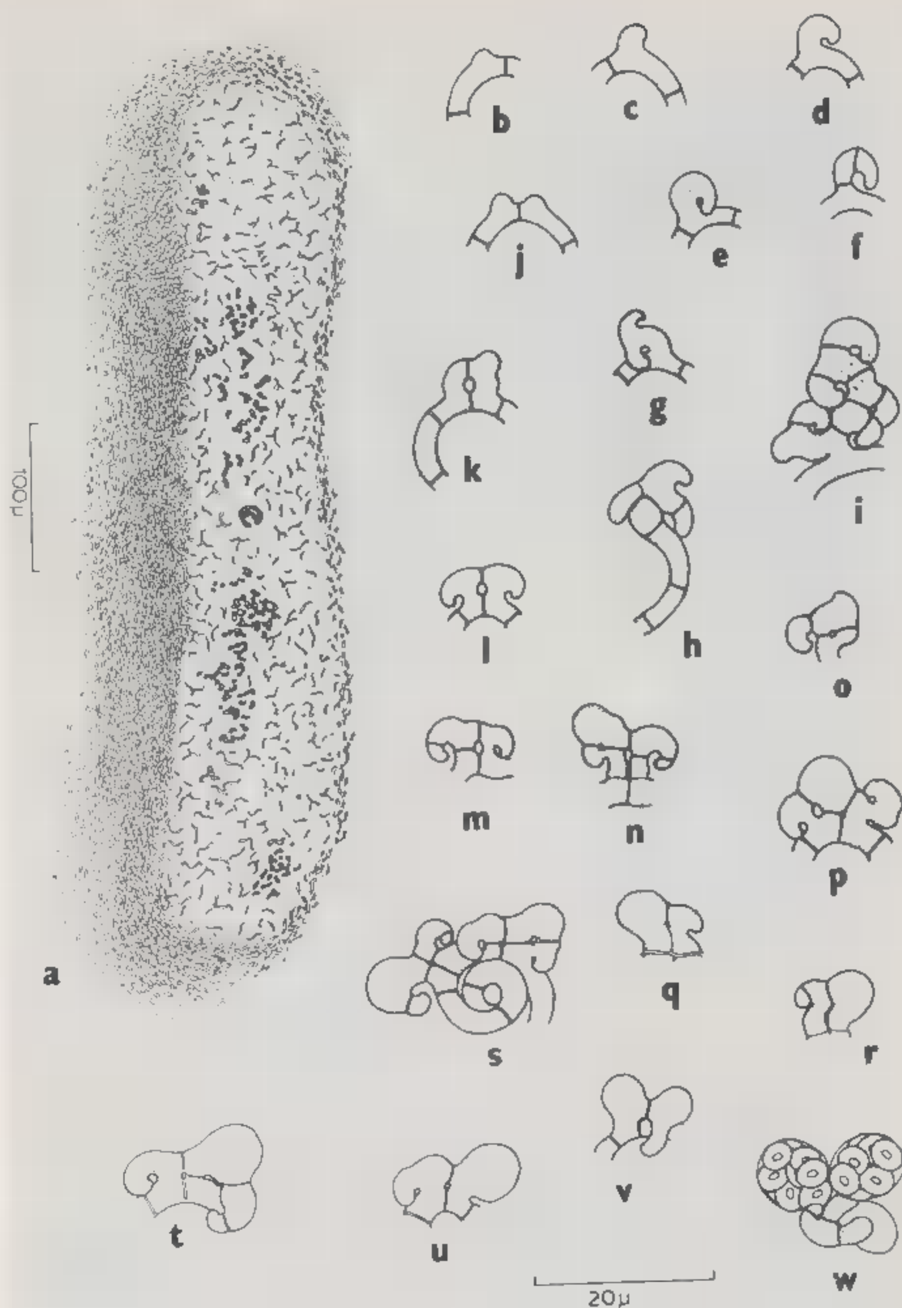


Fig. 1. - *Thermoascus aurantiacus* — a, showing a stroma containing several ascogonial curls (section); b-g, development of ascogonial curls - note in fig. a and f, vegetative hypha entangled within the curl; h, a septate ascogonial curl; i, initiation of croziers from cells of an ascogonial curl.



g. 2. - *Thermoascus aurantiacus* — a, stroma at a later stage of development - note that the basipetal region of stroma is more compact than before (compare fig. 1, a) - note also loosely woven stromal hyphae and ascogonial curls and croziers (section); b-f, development of croziers; g-i, production of secondary, tertiary and quaternary croziers; j-m, another pattern of crozier formation; n-w, development of asci and ascospores.

establishing connection with the adjacent cell. A septum now cuts the loop into two halves; each half develops a crozier in the usual way (fig. 2, k-m). The penultimate cell of each crozier enlarges and becomes an ascus. The tip cell of each crozier now becomes bent down and fuses either with the basal cell of the crozier (fig. 2, n) or the neighbouring ascogonial cell (fig. 2, p) and the process may be repeated so that several groups of croziers and asci are seen to develop from each ascogonial curl (fig. 2, q-w).

Finally eight ascospores become differentiated within each ascus. The asci lie scattered irregularly throughout the central tissue of the stroma (fig. 3, a, b).

The central system of narrow hyphae from which the ascogonial curls originally developed are seen to remain in the central part of the stroma even after the asci develop and mature (fig. 3, a, b), though they slowly get disintegrated in the final stage of maturation of the ascocarp.

The asci deliquesce and free the ascospores so that the ascospores from the numerous asci now fill the central cavity of the stroma (fig. 4, a; Pl. 1, fig. 3). At this stage in the development of the stroma, the fungus colony becomes almost brown in colour. No «ostiole» was observed.

Sometimes, as development proceeds, the individual stromata enlarge and get pressed against each other. Their wall layers get compressed and, by the dissolution of intervening wall layers, they merge into each other so that an apparently large stroma may be formed by the coalescence of more than one stroma. Such large stromata are frequently observed in somewhat aged cultures.

A section of mature stroma shows a large central cavity with ascospores lying free within and surrounded by an irregular tissue of polyhedral cells of somewhat two distinct zones - an inner deeply staining zone of comparatively smaller cells, and an outer somewhat hyaline not so deeply staining zone of larger cells; remnants of loose narrow hyphal branches are seen to project from the outer layer of this pseudoparenchymatous tissue.

GERMINATION OF ASCOSPORES (Fig. 4, g-o)

The ascospores germinate very rapidly. Germination takes place within 6 hours of incubation on dialysis tubings placed on YpSs agar medium at a temperature of 38-40°C. During germination, a small pore is formed on one side of the ascospore, mostly on the ventral side. Through this pore a protrusion emerges from within and assumes a vesicular appearance; this vesicular aspect is retained in further development. One or more extensions (germ tubes) develop from the vesicular part and grow. These branches become septate and produce the vegetative mycelium.

In certain cases, especially when ascospore germination was studied directly on media (i. e., not on dialysis tubing), the ascospore swells considerably, and one or more germ tubes emerge directly from within the ascospore. In



Fig. 3. - *Thermoascus aurantiacus* – a, b, section of ascostroma with central cavity and well developed pseudoparenchymatous tissue all round - note the presence of vegetative narrow hyphae and asci in the cavity; c, a group of asci; d, asci (? young); e, mature asci with ascospores.

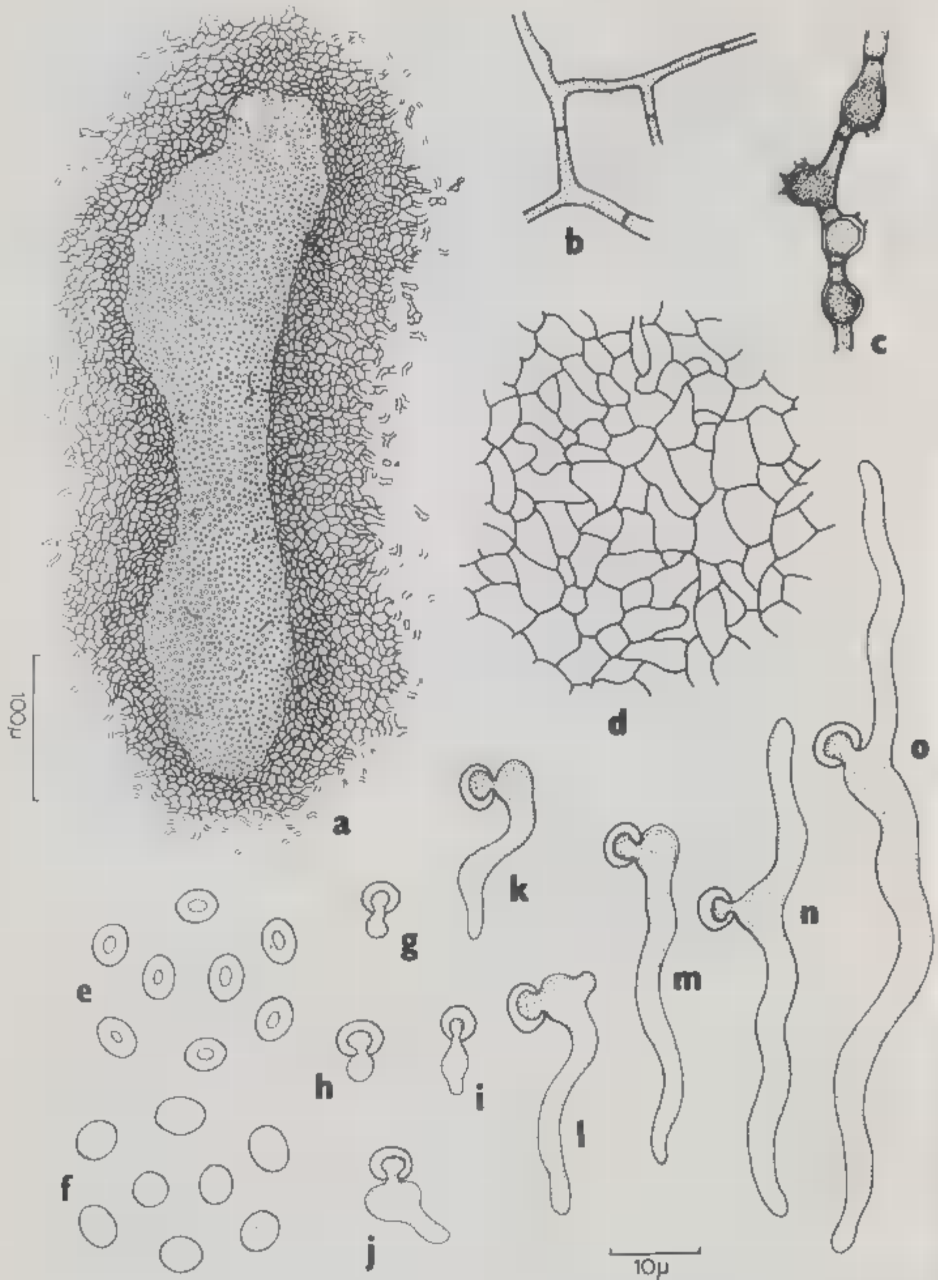


Fig. 4. - *Thermoascus aurantiacus* – a, mature ascostroma with ascospores within the stromal cavity (section); b, stromatic hyphae, young stage; c, stromatic hyphae, older stage; d, surface view of a part of ascostroma; e, mature ascospores; f, ascospores (? young); g-o, germination of ascospores.

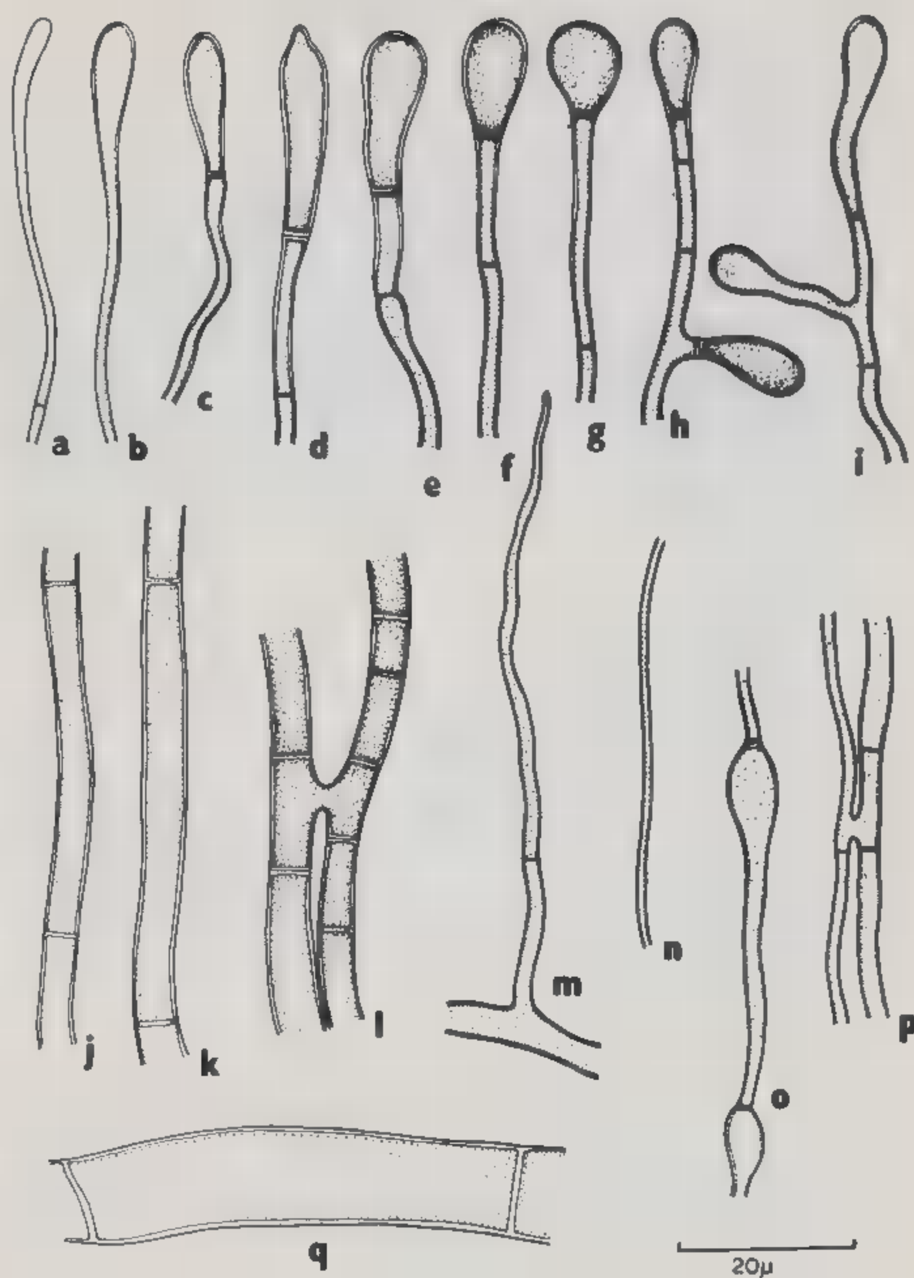


Fig. 5. - *Thermoascus aurantiacus* — a-i, development of gangliar conidia; j-q, variation in the size of hyphae - note hyphal fusion in fig. l and p and raquette hypha in fig. o.

such case, the vesicular structure is not visible outside the ascospore during germination.

DEVELOPMENT OF THE ANAMORPH

The present fungus was not found to produce any phialidic state. However, the production of gangliar conidia was frequently observed in cultures grown on YpSs agar medium.

During the formation of gangliar conidia, the terminal portion of an ordinary vegetative hypha swells (fig. 5, a, b). The swelling increases in size as it develops further and is then cut off by a septum separating the swelling from the subtending hyphae (fig. 5, c-g). Due to further development the wall of the swelling becomes thick, and finally this terminal swollen part becomes transformed into a gangliar conidium (Pl. I, fig. 4). Later, from any point on the conidiophore one or two lateral branches arise; the terminal portion of each of these lateral branches may also swell and become gangliar conidia (fig. 5, h, i).

TAXONOMY

The genus *Thermoascus* Miehe (MIEHE, 1907) is based on *T. aurantiacus* Miehe. Unfortunately, no type material seems to exist and the present study is based on IMI 67936.

The unique features of this fungus are as follows. The ascocarp is an ascostroma. To begin with, the ascostroma is prosenchymatous and of variable extent (fig. 1, a). Several ascogonia develop within an ascostroma. A mature ascocarp has a distinct and conspicuous envelope of pseudoparenchymatous cells of variable thickness, usually 8-12 cells thick (fig. 4, a). This is what has been usually referred to in descriptions as the peridium. However, from the present developmental study we are inclined to believe that this pseudoparenchymatous tissue represents the finale in development of the ascostroma so that we now have in place of prosenchymatous tissue a pseudoparenchymatous one. If this interpretation is correct, then the ascocarp in this fungus lacks a peridium sensu stricto.

No phialide state developed in culture such as has been claimed by COONEY and EMERSON (1964). However, conidia of gangliar type were found. It is noteworthy that MIEHE also found no phialide state associated with this fungus.

Thermoascus seems to be a good genus and must be retained. It is quite distinct from the other genera studied by the authors. As interpreted here, it is an ascostromatic form in which the ascocarp is without a peridium and develops in a cavity in an ascostroma.

We are grateful to the Director, C.M.I., for the culture of *Thermoascus aurantiacus* on which the present study is based.

REFERENCES

APINIS A.E., 1967 – *Dactylomyces* and *Thermoascus*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 50 : 573-582.

CARMICHAEL J.W., 1955 – Lactofuchsin : a new medium for mounting fungi. *Mycologia* 47 : 611.

COONEY D.G. & EMERSON R., 1964 – Thermophilic Fungi. An account of their Biology, Activities and Classification. W. H. Freeman and Company, San Francisco and London, 188 p.

JOHANSEN D.A., 1940 – Plant Microtechnique. McGraw Hill Book Company, Inc., New York and London, 524 p.

MIEHE H., 1907 – Die Selbsterhitzung des Heues. Jena : G. Fischer.

PURVIS M.J., COLLIER D.C. & WALLS D., 1964 – Laboratory Techniques in Botany. Butterworths, London, 371 p.

SUBRAMANIAN C.V. & RAJENDRAN C., 1979 – Ascomycetes IV. Developmental morphology of *Chaetosartorya chrysella* Subram. *Rev. de Mycol.* 43 : 193-203.

ERRATUM :

Dans *Cryptogamie - Mycologie*, Tome 1, fasc. 1, page 7 (article de H. DECHARME et M. ISSALY), la figure 1 doit être complétée de la façon suivante :

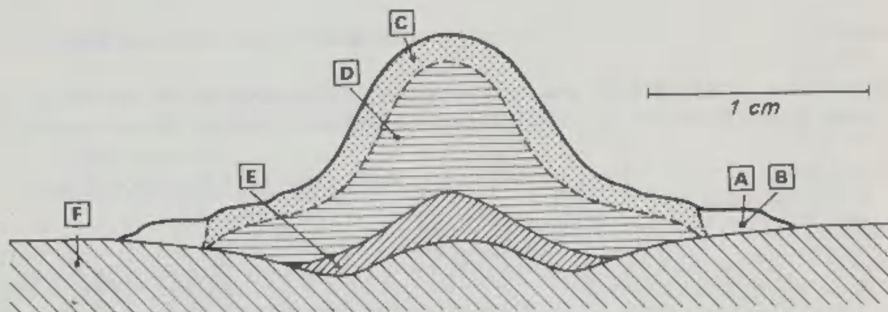


Fig. 1. — Schéma d'une colonie du champignon symbiote d'*Acromyrmex octospinosus*, d'un mois sur milieu gélosé (F).
Mycélium du front de culture : zone A : colonisation du milieu, zone B : croissance du mycélium aérien. Zone C : couche superficielle de différenciation des *gongylidia*. Zone D : couche médiane d'empilement et d'entassement des structures. Zone E : couche pseudo-stromatique.



Commission paritaire 15-8-1980 n° 58611
Dépôt légal n° 10620 – Imprimerie de Montligeon
Sorti des presses le 15 août 1980

ABONNEMENTS A CRYPTOGAMIE - MYCOLOGIE

Tome I 1980 - Tome 2 1981

France . . . . 160 F
Étranger . . . . 190 F

REVUE DE MYCOLOGIE
PRIX DES TOMES 1 (1942) à 43 (1979)

France . . . . 150 F
Étranger . . . . 190 F
Collection complète . . . . réduction de 20% par tome.

(Seuls certains fascicules peuvent être vendus séparément au prix de 35 F et 45 F pour l'étranger).

MÉMOIRES HORS-SÉRIE DISPONIBLES

Nº 2 (1942). Les matières colorantes des champignons, par I. Pastac. 88 pages : 15 F.

Nº 3 (1943). Les constituants de la membrane chez les champignons par R. Ulrich. 44 pages : 15 F.

Nº 6 (1958). Essai biotaxonomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés par J. Boidin. 390 pages, pl. et fig. : 70 F.

Nº 7 (1959). Les champignons et nous (Chroniques) (II), par G. Becker. 94 pages : 25 F.

Nº 8 (1966). Catalogue de la Mycothèque de la Chaire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle. (I) Micromycètes. Macromycètes (première partie). 68 pages : 25 F.

Nº 9 (1967). Table des Matières (1936-1965) 85 p. 20 F. - (1966-1975) 40 p. 10 F.

Nº 10 (1969). Le genre **Panaeolus**. Essai taxinomique et physiologique, par G.-M. Ola'h. 273 pages, pl. et fig. : 75 F.

FLORE MYCOLOGIQUE DE MADAGASCAR ET DÉPENDANCES,
publiée sous la direction de M. Roger HEIM.

Tome I. Les Lactario-Russulés, par Roger HEIM (1938) *(épuisé)*.

Tome II. Les Rhodophylles, par H. Romagnesi (1941), 164 pages, 46 fig. : 60 F.

Tome III. Les Mycènes, par Georges Métrod (1949). 144 pages, 88 fig. : 60 F.

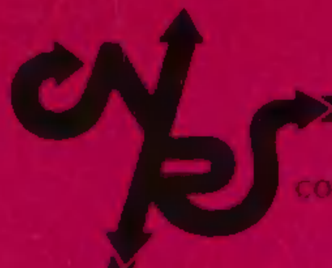
Tome IV. Les Discomycètes de Madagascar, par Marcelle Le Gal (1953). 465 pages, 172 fig. : 90 F.

Tome V. Les Urédinées, par Gilbert Bouriquet et J. P. Bassino (1965). 180 pages, 97 fig., 4 pl. hors-texte : 60 F.

Règlements :

– par virement postal au nom de Cryptogamie - Revue de Mycologie 12, rue de Buffon, 75005 PARIS, C.C.P. PARIS 6 193 02 K;

– par chèque bancaire établi au même ordre.



COLLOQUE INTERNATIONAL
du CNRS N° 258

ÉCHANGES IONIQUES TRANSMEMBRANAIRES CHEZ LES VÉGÉTAUX
TRANSMEMBRANE IONIC EXCHANGES IN PLANTS

org. : G. Ducet, R. Heller, M. Thellier
Universités de Rouen et Paris VII - 5-11 juillet 1976

● analyse des modeles théoriques ● recherche des couplages métaboliques ou autres ● études electrophysiologiques ● cas particulier des transferts d'anions et de molécules organiques ● localisation d'ions et aspects structuraux et moléculaires ● intervention d'échanges ioniques dans les régulations intercellulaires

- kinetic and thermodynamic considerations, model systems
- metabolic and other couplings, ATPases
- particular features of anionic transfers
- electrophysiology of the ionic transfer
- absorption of organic molécules
- localization, molecular and structural aspect of the transfers
- interference of the transmembrane transfers in other processes than absorption
- ion exchanges in cell organites

(69 communications dont 64 en anglais et 5 en français)

21 × 29, 7 - 608 pages - broché **180 F**
286 fig. - 89 tabl. - 30 phot.
ISBN 2-222-02021-2
(co-édition CNRS-Université de Rouen)

Editions du CNRS
15 quai Anatole France. 75700 Paris

CCP Paris 9061-11 - Tél. 555.92.25

M. ____________________
profession ____________________
adresse ____________________
achète le livre ____________________

chez son libraire ☐
à défaut aux Éditions du CNRS (chèque joint) ☐
et demande votre documentation
☐ Sciences humaines
☐ Sciences exactes et naturelles
☐ Trésor de la langue Française
☐ Revue de l'Art